

# **Phosphatidylinositolglycan-A Gentransfer in Glycosylphosphatidylinositol-defiziente Knochenmarkstammzellen**

Vom Fachbereich Biologie  
der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
**Doktor der Naturwissenschaften**  
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation  
von  
Dipl. Biol. Ingo Bastisch  
Geboren am 29. Januar 1965  
in Wiesbaden

**1999**

Referent: Prof. Dr. R. E. Schmidt  
Korreferent: Prof. Dr. U. Rüther  
Tag der Promotion: 15. Februar 1999

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Klinische Immunologie (Leiter Prof. Dr. R. E. Schmidt), Zentrum Innere Medizin und Dermatologie, der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt.

## Zusammenfassung

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine klonale Erkrankung des hämatopoetischen Systems. Das klinische Bild wird hauptsächlich durch das Auftreten von Hämolysen bestimmt. Als Ursache für diese Hämolysen gilt heute, daß Zellen des Knochenmarks und des peripheren Blutes keine GPI-verankerten Oberflächenmoleküle tragen. Zu diesen gehören CD55 und CD59, die auf den kernlosen Erythrozyten und Thrombozyten die einzigen komplementregulatorischen Proteine darstellen. Es kommt daher zur Komplement-vermittelten Lyse dieser Zellen. Das Fehlen der GPI-verankerten Oberflächenmoleküle wird durch eine erworbene Mutation im X-chromosomalen *PIG-A* Gen, dessen Genprodukt an der Biosynthese des GPI beteiligt ist, verursacht. Ein bisher ungeklärter Mechanismus bei der Pathogenese dieser Krankheit ist ein Wachstumsvorteil der GPI-defizienten im Vergleich zu den normalen Zellen. Um den Einfluß des *PIG-A* Gens im Zusammenhang mit dem Wachstumsvorteil studieren zu können, muß der Defekt auf der Ebene der undifferenzierten hämatopoetischen Vorläuferzelle korrigiert werden, so daß man Zellen zur Verfügung hat, die sich nur in der Expression des *PIG-A* Gens und damit in der Expression GPI-verankerter Oberflächenmoleküle unterscheiden. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit retrovirale Vektoren konstruiert, die das *PIG-A* Gen und ein selektionierbares Markergen trugen. Um die Funktion der exprimierten Gene zu überprüfen, wurde eine Jurkat-Mutante charakterisiert, die bedingt durch eine Mutation im *PIG-A* Gen keine GPI-verankerten Oberflächenmoleküle mehr exprimierte. Hier ließ sich der Defekt durch Transfektion mit Plasmid-DNA und durch Transduktion mit rekombinanten Retroviren komplementieren. Bei der Transduktion mit den viralen Vektoren zeigte sich eine Expression, die auch nach einem halben Jahr noch stabil war. Um hämatopoetische Zellen zu transduzieren, wurden zuerst *in vitro* Kulturbedingungen für eine optimale Stimulation geschaffen. Die Verwendung von Stammzellfaktor, Interleukin (IL)-3, IL-6 und Flt3-Ligand zeigte die besten Resultate in der Stimulation von CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem Knochenmark und peripheren Blut. Dieser Zytokincocktail wurde verwendet, um CD34<sup>+</sup>-Zellen zu stimulieren und mit Retroviren zu infizieren. Der Vergleich verschiedener Infektionsprotokolle ergab die besten Transduktionseffizienzen bei der Verwendung des Fibronectinfragmentes CH-296. Dieses Protokoll wurde schließlich auch verwendet, um CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen von PNH-Patienten zu infizieren. Nach Infektion zeigte sich eine Erhöhung des Anteils GPI-positiver Zellen um 69 %. Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit ein System entwickelt, das weitere Studien zur molekularen Pathogenese und möglicherweise der Therapie der PNH ermöglicht.

Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie; PIG-A Gen; retroviraler Gentransfer

## Summary

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a clonal disorder of the hematopoietic system. It is characterized by episodes of vascular hemolysis. A portion of the peripheral blood and bone marrow cells lack GPI-anchored cell surface molecules including the complement regulators CD55 and CD59. These are the only complement regulators on erythrocytes and platelets resulting in lysis of the deficient cells by the autologous complement. The absence of GPI-anchored proteins is caused by somatic mutations in the X-chromosomal *PIG-A* gene. The corresponding protein forms part of the biosynthetic pathway of the GPI-anchor. Apparently, the GPI deficient clone has a growth advantage compared to the GPI-positive cells. The underlying mechanism remains still unknown. For studying the influence of *PIG-A* in that mechanism, it would be necessary to complement the defect at the level of the hematopoietic stem or progenitor cell resulting in GPI-positive cells. Therefore it was the aim of this work to establish a protocol for transferring the *PIG-A* gene into GPI-deficient hematopoietic progenitors of PNH patients using retroviral vectors. Retroviral vectors containing the *PIG-A* gene and a selectable marker have been cloned. The vector plasmids were transfected into a GPI deficient Jurkat mutant and subsequently screened for reexpression of GPI-anchored proteins. Transduction of the cells using recombinant viruses resulted in stable expression of GPI-anchored molecules for at least six months. Conditions for transduction of CD34<sup>+</sup> progenitors have been established allowing efficient stimulation of these cells. Best results concerning stimulation of progenitors from peripheral blood or bone marrow were obtained by combining stem cell factor, interleukin (IL)-3, IL-6 and Flt3-ligand. This cytokinecocktail was used for stimulating and subsequently infecting CD34<sup>+</sup> cells. Comparison of different retroviral infection procedures was carried out. Best transduction efficiencies were observed using recombinant fibronectin fragment CH-296. Application of this protocol for the infection of CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup> cells of a PNH patient resulted in an increase of GPI-positive cells by 69 %. Thus a system was developed, allowing further studies of molecular mechanisms leading to PNH and giving possible therapeutic approaches towards PNH.

Paroxysma nocturnal hemoglobinuria; PIG-A gene; retrovirus-mediated genetransfer

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 EINLEITUNG .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 DIE PAROXYSMALE NÄCHTLICHE HÄMOGLOBINURIE .....  | 1         |
| 1.2 ZIELSETZUNG .....  | 16        |
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>   | <b>17</b> |
| 2.1 MATERIAL .....   | 17        |
| 2.1.1 Zelllinien .....   | 17        |
| 2.1.2 Bakterienstämme .....  | 18        |
| 2.1.3 Chemikalien .....  | 18        |
| 2.1.4 Stammlösungen und Medien .....   | 22        |
| 2.1.5 Verbrauchsmaterialien .....  | 25        |
| 2.1.6 Geräte .....   | 26        |
| 2.2 METHODEN .....   | 27        |
| 2.2.1 Mikrobiologische Methoden .....  | 27        |
| 2.2.2 Zellkultur .....   | 28        |
| 2.2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden .....   | 40        |
| <b>3 ERGEBNISSE .....</b>  | <b>53</b> |
| 3.1 CHARAKTERISIERUNG VON <i>IN VITRO</i> MUTAGENISIERTEN JURKAT ZELLEN .....  | 54        |
| 3.1.1 Sequenzierung des <i>PIG-A</i> Gens .....  | 54        |
| 3.1.2 Komplementierung des <i>PIG-A</i> Defektes .....   | 58        |
| 3.1.3 Funktionelle Untersuchungen .....  | 59        |
| 3.2 HERSTELLUNG RETROVIRALER VEKTOREN .....  | 64        |
| 3.2.1 Vektorklonierungen .....   | 64        |
| 3.3 STIMULATION VON CD34 <sup>+</sup> -KNOCHENMARKVORLÄUFERZELLEN .....  | 72        |
| 3.3.1 Vergleich der Koloniebildungsfähigkeit angereicherter peripherer Stammzellen nach<br>zweitägiger Stimulation .....             | 73        |
| 3.3.2 Vergleichende Analyse der relativen und absoluten Koloniezahlen über verschiedene<br>Zeiträume mit verschiedenen Stimuli ..... | 75        |
| 3.3.3 Untersuchung des Einflusses von Thrombopoetin, SDF-1 und IL-11 auf die Kultivierung<br>hämatopoetischer Progenitoren .....     | 82        |
| 3.3.4 Stimulation von angereicherten hämatopoetischen Progenitoren eines PNH-Patienten .....   | 86        |
| 3.4 RETROVIRALE TRANSDUKTION .....   | 90        |
| 3.4.1 Herstellung von Produzentenzellen .....  | 90        |
| 3.4.2 Stabile Transduktion der GPI-defizienten Jurkat-Zellen .....   | 92        |
| 3.4.3 Transduktion von CD34 <sup>+</sup> -Zellen von Normalspendern .....  | 95        |

|   |            |
|---|------------|
| 3.4.4 Transduktion von CD34 <sup>+</sup> -Zellen von PNH-Patienten..... | 104        |
| <b>4 DISKUSSION.....</b>  | <b>107</b> |
| 4.1 CHARAKTERISIERUNG DER JURKAT-MUTANTEN.....                          | 107        |
| 4.2 DIE RETROVIRALEN VEKTOREN UND VERPACKUNGSZELLEN .....               | 109        |
| 4.3 DIE <i>IN VITRO</i> KULTUR HÄMATOPOETISCHER ZELLEN .....            | 112        |
| 4.4 RETROVIRALE TRANSDUKTION CD34 <sup>+</sup> -ZELLEN .....            | 114        |
| 4.5 AUSBLICK .....  | 116        |
| 4.5.1 Untersuchungen zur Pathogenese der PNH.....                       | 116        |
| 4.5.2 Gentherapie für PNH .....   | 117        |
| <b>5 ABKÜRZUNGEN .....</b>  | <b>119</b> |
| <b>6 HERSTELLERVERZEICHNIS .....</b>                                    | <b>122</b> |
| <b>7 REFERENZEN.....</b>  | <b>124</b> |
| <b>8 DANKSAGUNG .....</b>   | <b>142</b> |
| <b>9 LEBENS LAUF .....</b>  | <b>144</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie

Die paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie (PNH) ist eine seltene Erkrankung des hämatopoetischen Systems mit einer Prävalenz von etwa ein bis zehn Fällen pro Million (Bessler and Hillmen 1998, Luzzatto et al. 1997). Die Erkrankung, von der Männer wie Frauen gleichermaßen betroffen sind, setzt im allgemeinen im Erwachsenenalter ein (Socie et al. 1996), obwohl auch zahlreiche Fälle von Erkrankungen in der Kindheit und Jugend bekannt sind (Ware et al. 1991).

Ein wesentlicher Beitrag zur Pathogenese, zur Symptomatik und zur Prognose wurde in zwei Langzeitstudien geleistet, die die Entwicklung von 80 Patienten für einen Zeitraum von bis zu 48 Jahren (Hillmen et al. 1995) bzw. den Verlauf der Krankheit bei 220 Patienten über einen Zeitraum von 46 Jahren (Socie et al. 1996) verfolgten. Die klinischen Symptome dieser Krankheit sind intravaskuläre Hämolysen bei ca. 84 % der Patienten und dadurch bedingt renale Hämoglobinausscheidung sowie eine Anämie. Die häufigste Komplikation, auch die häufigste Todesursache, ist eine verstärkte Neigung zu Thrombosen. Darüber hinaus wurden bei PNH-Patienten schwere Störungen im Knochenmark gefunden, die von Hyperplasie bis zur Hypoplasie variieren können. Diese schweren Komplikationen, die mit der PNH in Zusammenhang stehen, führen zu einer verkürzten Lebenserwartung. In verschiedenen Studien wurden Überlebensraten für den Zeitraum von zehn Jahren nach Diagnosestellung von 66 % (Socie et al. 1996), 50 % (Hillmen et al. 1995) und 71 % (Fujioka and Takayoshi 1989) ermittelt.

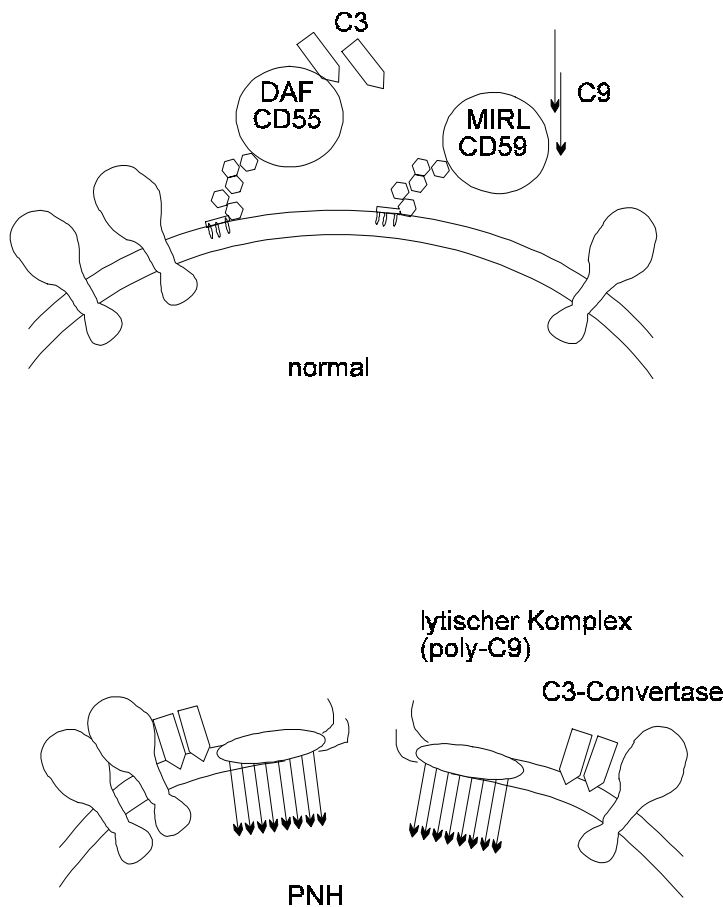
Das Krankheitsbild der PNH wurde erstmals 1882 von Paul Strübing beschrieben (Strübing 1882). Er beschrieb diese Krankheit als eine neue Form der hämolytischen Anämie, die sich von der in dieser Zeit häufigen Syphilis-assoziierten hämolytischen Anämie unterschied. Er fand auch heraus, daß die Ursache in einem Defekt der Erythrozytenmembran liegen mußte. Die Diagnostik der PNH wurde ermöglicht, als Ham 1937 den Säurehämolysetest beschrieb, bei dem Erythrozyten in angesäuertem Serum inkubiert wurden (Ham 1937). Die Zellen von Patienten mit PNH wurden dabei zum größten Teil lytiert. Später zeigte sich, daß die Lyse auf die Komplementaktivität im Serum zurückzuführen war (Rosse and Dacie 1966a). In einer nachfolgenden Publikation konnte



die Lyse dann einer späten Komponente der Komplementkaskade zugeordnet werden (Rosse and Dacie 1966b). Untersuchungen an säureaktivierten Komplementkomponenten zeigten vornehmlich eine Aktivierung des C5b,6-Komplexes und der Komponenten C7-9, wodurch die PNH-Erythrozyten zerstört wurden (Hänsch et al. 1983). Der zentrale Schritt ist demnach die Bildung des *membrane-attack-complex*, wodurch es zu einer Perforation der Zellmembran und zur anschließenden Lyse der Zellen kommt. Diese Beobachtungen wurden weiter durch die Beschreibung des Falls einer PNH-Patientin mit C9-Defizienz, die keine Hämolyse ausbildete, bestätigt (Yonemura et al. 1990).

Es wurde schon sehr früh gezeigt, daß PNH-Patienten zwei verschiedene Erythrozytenpopulationen hatten: eine, die empfindlich gegenüber Komplement war und eine andere, die keine erhöhte Komplementempfindlichkeit zeigte (Rosse and Dacie 1966a). Aus dieser Beobachtung wurde die Vermutung abgeleitet, daß es sich um einen erworbenen klonalen Defekt handeln könne. Wenige Jahre später wurde dann durch Analysen eines Glucose-6-phosphat-dehydrogenase Polymorphismus die Klonalität der komplementempfindlichen Erythrozyten nachgewiesen (Oni et al. 1970). Durch DNA-Analysen wurde der Klonalitätsnachweis auf Lymphozyten und Granulozyten ausgeweitet (Josten et al. 1991).

Später zeigten phänotypische Analysen, daß die Erythrozyten von PNH-Patienten die komplementregulierenden Proteine *decay accelerating factor* (DAF, CD55) (Nicholson-Weller et al. 1983, Pangburn et al. 1983) und *membrane inhibitor of reactive lysis* (MIRL, CD59) (Holguin et al. 1989b) nicht auf der Zelloberfläche exprimieren. Diese Proteine stellen auf den Membranen der kernlosen Zellen die einzigen komplementregulatorischen Proteine dar, so daß deren Abwesenheit zu einer Lyse dieser Zellen durch autologes Komplement führt (Abbildung 1). Blockierungsexperimente, bei denen normale Erythrozyten mit gegen CD59 gerichteten polyklonalen Antikörpern inkubiert wurden, zeigten eine Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber Komplement, die mit der von PNH-Erythrozyten vergleichbar ist (Rosse 1990). Diese Beobachtung führte zu dem Schluß, daß bei PNH-Patienten vor allem die Abwesenheit von CD59 für die Lyse der Erythrozyten verantwortlich ist. Bestätigt wurde diese Vermutung noch durch die Beschreibung des Falls eines Patienten mit angeborener CD59-Defizienz, der alle Symptome einer PNH zeigte (Yonemura et al. 1990).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung einer normalen Erythrozytenmembran (oben) und der Erythrozytenmembran eines PNH-Patienten (unten).**

Die Moleküle DAF (CD55) und MRL (CD59) verhindert auf normalen Membranen die Bindung der Komplementkomponenten. Bei Zellmembranen von PNH-Erythrozyten kommt es durch das Fehlen dieser Moleküle zur Ausbildung des *membrane-attack-complex* mit nachfolgender Lyse der Zellen (Schubert and Schmidt 1992).

Grundlage für weitere Fortschritte in der Aufklärung der Ursache für das Fehlen dieser Proteine beruhten auf der Entdeckung der bakteriellen Phospholipase in den sechziger Jahren (Slein and Logan 1960, Slein and Logan 1962, Slein and Logan 1963, Slein and Logan 1965). Durch Behandlung von Zellen mit Phosphatidylinositol-spezifischer Phospholipase C (PI-PLC) ließ sich die membrangebundene alkalische Phosphatase von Zellen abspalten (Ikezawa et al. 1976, Low and Finean 1977). Aus diesen und anderen Experimenten leitete man ab, daß diese Proteine mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker auf der Zelloberfläche befestigt sind, da die PI-PLC das Phosphatidylinositol

(PI) zwischen der Phosphatgruppe und dem Glycerin-Rückgrat spaltet (Low and Kincade 1985) (Davitz et al. 1986, Zalman et al. 1987). Bei den PNH-Zellen fehlten die Oberflächenmoleküle, die sich durch PI-PLC abspalten ließen. Durch weitere Untersuchungen mit PI-PLC wurde noch eine Vielzahl weiterer Oberflächenproteine identifiziert, die auf Zellen von PNH-Patienten fehlen und GPI-verankert sind. Diese Proteine sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

**Tabelle 1: GPI verankerte Zelloberflächenproteine humaner Blutzellen**

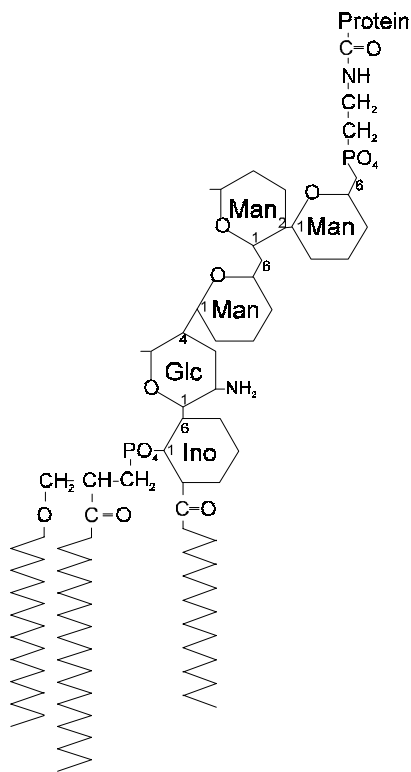
| Name  | Vorkommen                  |  |
|---|----------------------------|--|
| CD55 (decay accelerating factor)            | Alle Zellen                | (Nicholson-Weller et al. 1983)<br>(Pangburn et al. 1983) |
| CD59 (Membrane inhibitor of reactive lysis) | Alle Zellen                | (Holguin et al. 1989a)                                   |
| Homologous restriction factor               | Erythrozyten, Thrombozyten | (Hänsch et al. 1987)                                     |
| Acetylcholinesterase                        | Erythrozyten               | (Kunstling and Rosse 1969)                               |
| Alkalische Phosphatase                      | Granulozyten               | (Beck and Valentine 1951)                                |
| CD73 (5'-Ektonukleotidase)                  | Lymphozyten                | (Misumi et al. 1990)                                     |
| CD16 (Fcγ Rezeptor IIIB)                    | Granulozyten               | (Selvaraj et al. 1988)                                   |
| Urokinase Rezeptor                          | Granulozyten, Monozyten    | (Ploug et al. 1992)                                      |
| Folat Rezeptor                              |                            | (Antony 1992)  |
| CD14 (Endotoxin binding protein receptor)   | Monozyten                  | (Simmons et al. 1989)                                    |
| CD58 (LFA-3)                                | Alle Zellen                | (Selvaraj et al. 1987)                                   |
| CD48 (Blast-1)                              | Lymphozyten                | (Staunton et al. 1989)                                   |
| CD52 (Campath-1)                            | Lymphozyten, Monozyten     | (Nagakura et al. 1993)                                   |
| JMH-bearing protein                         | Erythrozyten               | (Bobolis et al. 1992)                                    |
| CD24  | B-Zellen, Granulozyten     | (van der Schoot et al. 1990)                             |
| CD66c                                       | Granulozyten               | (Mayne et al. 1993)                                      |
| GP500                                       | Thrombozyten               | (Bessler and Hillmen 1998)                               |
| CDw109 (GP175)                              | Thrombozyten               | (Smith et al. 1995)                                      |

Das Fehlen GPI-verankerter Proteine auf Zellen des peripheren Blutes von PNH-Patienten erlaubt eine differenzierte Analyse dieser Zellen und eine Verlaufsbeobachtung der Krankheit auf zellulärem Niveau durch durchflußzytometrische Analysen (Schubert et al. 1991, Schubert and Schmidt 1992), die den Säurehämolysetest in der Diagnostik weitestgehend ersetzt haben.

Diese Untersuchungen bestätigten, daß das GPI in dieser Krankheit eine entscheidende Rolle spielt und der Defekt entweder in der Synthese des GPI oder in der Verknüpfung der Proteine mit dem GPI liegen mußte.

GPI sind in der Evolution weit verbreitet und für die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*, den Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Early et al. 1988), bei *Paramecium* (Deregnaucourt et al. 1988), bei den intrazellulären Parasiten *Toxoplasma* (Tomavo et al. 1989) und *Plasmodium* (Braun Breton et al. 1988), dem Flagellaten *Giardia lamblia* (Das et al. 1991), den Trypasomatiden *Leishmania* und *Trypanosoma*, den Fliegen *Musca domestica* und *Drosophila melanogaster* (Fournier et al. 1988), dem Tintenfisch und allen bisher untersuchten Vertebraten beschrieben. In zahlreichen Untersuchungen an den verschiedenen Organismen wurden vielfältige Beiträge zu Struktur und Synthese von GPI geleistet.

Die Grundstruktur des GPI-Ankers ist in Abbildung 2 dargestellt. Das GPI besteht aus einem *myo*-Inositol, das in Position 1 über eine Phosphatgruppe mit einem Lipid verbunden ist. An Position 6 ist das Inositol mit der Position 1 eines Glucosamin verbunden, an dem sich an Position 4 drei Mannosen befinden (Man1-6Man1-2Man). An Position 6 der distalen Mannose befindet sich ein Phosphoethanolamin, dessen Aminogruppe mit der Carboxygruppe des verankerten Proteins verbunden ist. Im allgemeinen ist das Inositol an Position 2 noch acyliert. Die Länge und die Zusammensetzung der Lipide kann je nach Organismus, Zelltyp und verankertem Protein variieren. Des weiteren besteht noch eine Varianz bezüglich weiterer Glycosylierungen und der Addition von Phosphoethanolaminen (Übersichtsartikel in Englund 1993, McConville and Ferguson 1993, Tiede et al. 1998a).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Struktur eines GPI-Ankers**

Die Aufklärung der GPI-Synthese wurde hauptsächlich durch Studien an Trypanosomen, *S. cerevisiae*, an Maus-Lymphommutanten und Zellen von Patienten mit PNH durchgeführt. Die Synthese des GPI findet in mehreren aufeinanderfolgenden Schritten im endoplasmatischen Reticulum statt (Abbildung 3). Auf ein membrangebundenes PI wird auf der cytosolischen Seite des ER ein *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) auf die Position 6 des Inositol übertragen, so daß es zur Bildung von GlcNAc-PI kommt (Stevens and Raetz 1991). Der nächste Schritt besteht in einer Deacetylierung des GlcNAc-PI zu GlcN-PI (Doering et al. 1989, Hirose et al. 1991). Bei Säugern schließt sich als nächstes eine Acylierung der Position 2 des Inositol zu GlcN-(acylinositol)-PI an (Costello and Orlean 1992, Urakaze et al. 1992). An die Position 4 des Glucosamin werden in drei aufeinanderfolgenden Schritten, in unabhängigen Reaktionen, Mannosen angehängt (Smith et al. 1997). An das so gebildete Man<sub>3</sub>-GlcN-(acylinositol)-PI wird in dem letzten essentiellen Schritt ein Phosphoethanolamin an die Position 6 der distalen Mannose transferiert (Puoti and Conzelmann 1993). An diese Phosphoethanolamingruppe wird in einem späteren Schritt der Carboxyterminus des zu verankernden Proteins transferiert.

Weitere Phosphoethanolaminingruppen können auch an die anderen Mannosen addiert werden.

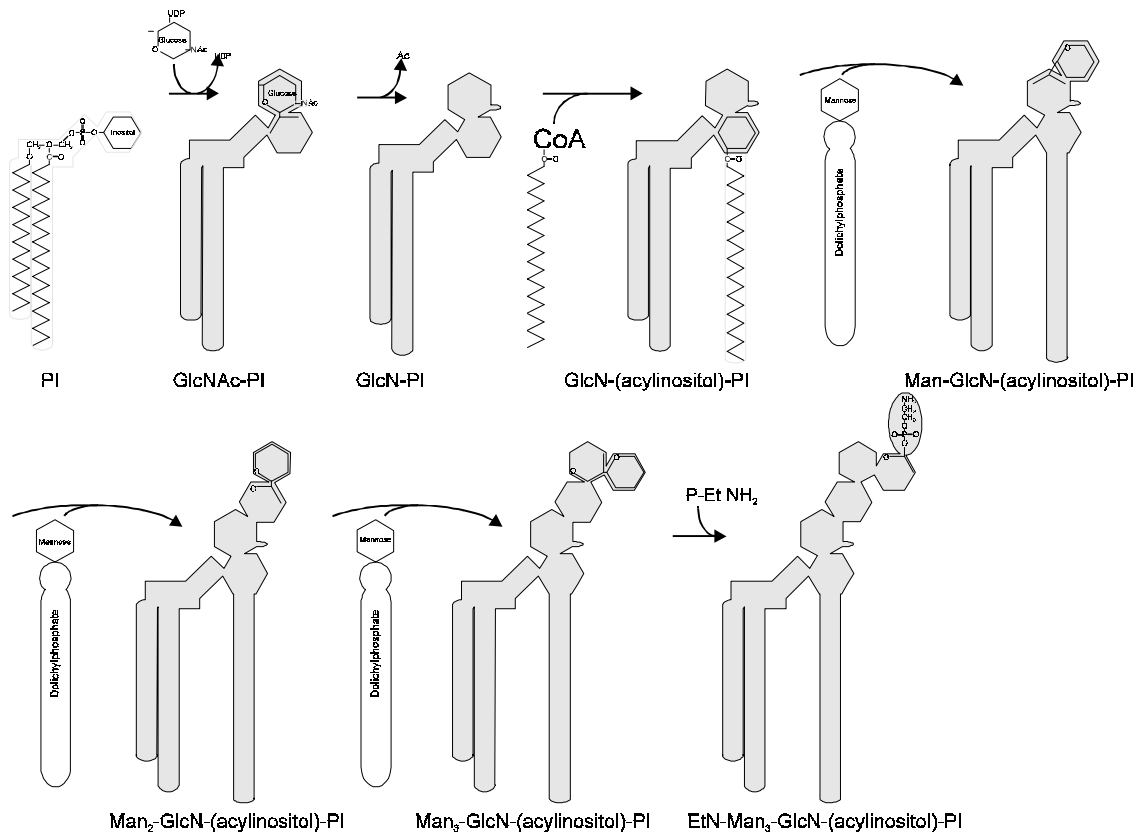


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Biosynthesewegs von GPI in Säugerzellen.

Durch Studien an Maus-Lymphomzellen, die das GPI-verankerte Thy-1 exprimierten (Low and Kincade 1985) bzw. aus davon abgeleiteten Thy-1<sup>-</sup>-Mutanten, konnten über somatische Zell-Hybridisierungen neun Komplementationsklassen identifiziert werden, von welchen drei der Synthese des Thy-1 und sechs der Synthese des GPI-Ankers zugerechnet wurden (Klasse A, B, C, E, F, H). Durch Markierung von Metaboliten konnten diesen sechs Mutanten vier verschiedenen Reaktionsschritten zugeordnet werden (Stevens and Raetz 1991, Sugiyama et al. 1991). Die Mutanten der Komplementationsklasse A, C und H zeigten bereits einen Defekt in dem ersten Schritt der Synthesekette, dem Transfer des GlcNAc auf das PI. Die Mutation der Komplementationsklasse E konnte die Synthese der Dolichylphosphat-Mannose, dem Mannosendonator für die GPI-Synthese, zugeordnet werden. Die Klasse B Mutante zeigte einen Defekt in der Addition der dritten Mannose. Die Mutante der Klasse F war nicht in der Lage, das Phosphoethanolamin auf die dritte Man-

nose zu übertragen. Die Einteilung in die verschiedenen Komplementationsklassen konnte auf das humane System übertragen werden, wie aus Studien an K562 Zellklonen hervorging, die das GPI-verankerte DAF nicht exprimierten (Hirose et al. 1992). Zellen von Patienten mit PNH zeigten einen Defekt in dem ersten Schritt, dem Transfer des GlcNAc auf das PI, und gehören so der Komplementationsklasse A an (Armstrong et al. 1992, Schubert et al. 1993).

Ein großer Durchbruch für die Aufklärung der Synthese von GPI war die Identifizierung des X-chromosomalen Gens *PIG-A* (Phosphatidylinositolglycangen Klasse A), welches durch das Screening einer Expressionsbibliothek gefunden wurde (Miyata et al. 1993). Das *PIG-A* Gen besteht aus sechs Exons. Die gespleißte mRNA besteht aus 3589 Nukleotiden und kodiert für ein Protein mit einer Länge von 484 Aminosäuren. Der GPI-Ankerdefekt der Zellen von Patienten mit PNH beruht auf Mutationen im *PIG-A* Gen (Bessler et al. 1994b, Ostendorf et al. 1995, Takeda et al. 1993). Nach der Charakterisierung des für die PNH spezifischen Gendefektes wurde das *PIG-A* Gen von sehr vielen Patienten mit PNH sequenziert und die Mutationen beschrieben (Nishimura et al. 1996, Pramoonjago et al. 1995, Savoia et al. 1996, Yamada et al. 1995). Diese Arbeiten zeigten, daß die Mutationen im *PIG-A* Gen heterogen sind und es innerhalb des *PIG-A* Gens keine *hot-spots*, also Bereiche mit gehäuften Mutationsraten, gibt.

Mittlerweile sind auch die Gene der anderen Komplementationsklassen kloniert worden. Für den ersten Schritt wurden die Gene *PIG-C* (Inoue et al. 1996) und *PIG-H* (Kamitani et al. 1993) kloniert. Durch Homologievergleiche mit den entsprechenden Komponenten konnte noch ein viertes Gen, *GPI-1*, kloniert werden (Tiede et al. 1998b, Watanabe et al. 1998). Die Deacetylierung des GlcNAc-PI wurde der Komplementationsklasse L zugeordnet, und das entsprechende Gen *PIG-L* wurde in der Ratte ebenfalls identifiziert (Nakamura et al. 1997). Des Weiteren wurden drei Gene *DPM1* (*PIG-E*) (Tomita et al. 1998), *DPM2* (LEC15) (Maeda et al. 1998) und *SL15* (LEC35) (Ware and Lehrman 1996) kloniert, die an der Synthese der Dolichylphosphat-Mannose beteiligt sind. Das Pig-b Protein, das den Transfer der dritten Mannose bewerkstelligt, (Takahashi et al. 1996) und Pig-f, welches das Phosphoethanolamin auf die dritte Mannose transferiert (Inoue et al. 1993), konnten ebenfalls identifiziert werden. Die Transamidasefunktion, also der eigentliche Transfer des Proteins auf den fertigen GPI-Anker, konnte den Genprodukten der beiden Gene *GAA1* (Hiroi et al. 1998) und *GPI8* (Yu et al. 1997) zugeordnet werden.

Im Gegensatz zu dem *PIG-A* Gen sind diese Gene alle auf Autosomen lokalisiert. Eine Assoziation dieser Gene mit der PNH ist bisher noch nicht nachgewiesen worden. Eine einzige Mutation kann im X-chromosomalen *PIG-A* Gen bereits dazu führen, daß der Biosyntheseweg unterbrochen ist, während beide Allele irgendeines anderen Gens mutiert sein müßten, um einen Phänotyp zu zeigen.

Der Defekt im *PIG-A* Gen erklärt, wieso es bei der PNH zur GPI-Defizienz und dadurch bedingt zur Abwesenheit verschiedener Oberflächenmoleküle kommt, wodurch sich die Entstehung von Hämolyse erklären läßt. Eine entscheidende Frage bleibt allerdings noch unbeantwortet, nämlich, wieso es möglich ist, daß sich ein Klon, dessen Ursprung sich auf eine einzige Zelle zurückführen läßt, überhaupt so weit durchsetzen kann, daß es zum Auftreten einer Krankheit kommt. Während des Fortschreitens der PNH nimmt im allgemeinen die relative Größe des PNH-Klons zu. Hiervon sind alle Zelltypen des peripheren Blutes betroffen, so daß davon ausgegangen werden muß, daß der GPI-defiziente Klon auf der Ebene der pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle einen Wachstumsvorteil im Vergleich zu anderen Stammzellen haben muß.

Von den insgesamt 366 Patienten, die in den verschiedenen Langzeitstudien beobachtet wurden, entwickelten drei Patienten eine akute myeloide Leukämie (AML), bei einem Patienten trugen die Leukämiezellen sogar die GPI-Defizienz (Bessler and Hillmen 1998, Devine et al. 1987). Das Risiko für PNH-Patienten, an AML zu erkranken, ist mit 6 % vergleichbar mit dem von Patienten mit aplastischer Anämie (AA) und um den Faktor 85 größer als für die Durchschnittsbevölkerung (Dameshek 1969, Socie et al. 1993). Leukämiezellen zeigen ebenfalls einen Wachstumsvorteil im Vergleich zu normalen Zellen. Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, daß den PNH-Zellen ein vergleichbarer Mechanismus bezüglich des Wachstumsvorteils wie den AML-Zellen zugrundeliegt. Daher könnte es sein, daß die PNH eine präleukämische Erkrankung darstellt. Es wurden Untersuchungen an Zellen eines PNH-Patienten durchgeführt, der eine AML entwickelte. Es zeigte sich, daß die PNH-Zellen keine Veränderungen in der Chromosomenstruktur oder in der Expression verschiedener Protoonkogenen wie *c-myc*, *c-myb*, *c-fos* oder *c-fms* zeigten (Stafford et al. 1995).

Die Beobachtung, daß bei allen bisher untersuchten Patienten mit PNH ein Defekt im *PIG-A* Gen gefunden wurde, bedeutet nicht zwangsläufig, daß eine Mutation im *PIG-A* Gen, selbst wenn diese zum Fehlen von GPI-Ankern führt, zur Entstehung einer PNH



führt. Patienten, die aufgrund eines B-Zell-Lymphoms mit Campath-1H, einem Antikörper gegen das GPI-verankerte CD52, behandelt wurden, zeigten nach einiger Zeit eine Manifestation von CD52<sup>+</sup>-T-Zellen (Hertenstein et al. 1995). Bei zwei der drei untersuchten Patienten wurde darüber hinaus noch die Abwesenheit von CD48 und CD59 auf den CD52<sup>+</sup>-T-Zellen festgestellt, die sich mit einem Defekt im *PIG-A* Gen erklären ließ. Durch diese Arbeit wurde der Beweis erbracht, daß sich auch bei Menschen, die keine PNH haben, unter bestimmten äußeren Bedingungen ein präexistenter GPI-defizienter Klon durchsetzen kann. Aufgrund dieser Arbeit ergab sich die Frage, ob es sich bei der PNH tatsächlich um eine monoklonale Erkrankung handelt. Verschiedene Veröffentlichungen beschrieben Patienten, die mehr als einen GPI-defizienten Klon in sich trugen (Bessler et al. 1994a, Endo et al. 1996b, Yamada et al. 1995). Mehr als ein GPI-defizienter Klon soll sogar in ca. 70 % aller PNH-Patienten zu finden sein (Peter Hillmen, ISH-EHA Amsterdam 1998, pers. Info.). Diese Resultate haben klar gezeigt, daß die PNH keine monoklonale Erkrankung ist. Vielmehr setzen sich wahrscheinlich ein oder mehrere präexistente GPI-defiziente Klone durch, wenn sich irgendwelche äußeren Umstände ändern. Es ist auch denkbar, daß weitere Mutationen diese Bedingungen schaffen.

Mehrere gleichzeitig existierende GPI-defiziente Klone könnten auch durch eine genetische Instabilität entstanden sein. Untersuchungen am Glycophorin A-Gen, das für ein auf Erythrozyten vorkommendes Sialoglycoprotein kodiert, können einen Aufschluß über die Frequenz somatischer Mutationen geben (Langlois et al. 1986). Dieser Assay wurde für die Untersuchung von Zellen von Patienten mit PNH, aplastischer Anämie und myelodysplastischem Syndrom, beides Krankheiten, die eng mit der PNH assoziiert sind, verwendet (Hattori et al. 1997). Es zeigte sich bei allen drei untersuchten Krankheiten eine, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, erhöhte Zahl varianter Zellen, die mit einer erhöhten genetischen Instabilität korrelierten. Des weiteren wurde festgestellt, daß bei Patienten mit PNH nicht nur die CD59-negativen sondern auch die CD59-positiven Zellen diese genetische Instabilität aufwiesen. Ob und inwieweit diese Instabilität zur Pathogenese der PNH beiträgt, konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden.

Es besteht auch die Möglichkeit, daß die Expansion von PNH-Klonen nicht auf einem relativen, durch äußere Faktoren bedingten Wachstumsvorteil, sondern auf einem echten intrinsischen Wachstumsvorteil beruht. Zwei unabhängig durchgeführte Untersuchungen an chimären *pig-a* knock-out Mäusen zeigten keinen Wachstumsvorteil für die GPI defizi-

enten Zellen, die zu einem sehr geringen Prozentsatz in diesen Mäusen persistierten (Kawagoe et al. 1996, Rosti et al. 1997). Interessanterweise entwickelte sich in jeweils einem Einzeltier in beiden Versuchsgruppen ein GPI-defizienter Klon, der an Größe zunahm. Der Verlauf konnte nur von einer Arbeitsgruppe näher charakterisiert werden. Es zeigte sich, daß von der GPI-Defizienz Erythrozyten, B- und T-Zellen betroffen waren. Der Anteil aller drei Zelltypen stieg im Lauf der Zeit an, so daß der Ursprung auf der Ebene der hämatopoetischen Stammzelle zu suchen war. Allerdings sprachen diese Beobachtungen gegen einen intrinsischen Wachstumsvorteil der GPI-defizienten Zellen, zumindest im Maus-Modell. Es schien wahrscheinlicher, daß eine äußere Veränderung stattgefunden hat, die das Wachstum der Zellen beeinflußte.

Eine sehr frühe Arbeit hat bereits gezeigt, daß die Hämatopoese, gemessen an den BFU-E im peripheren Blut, vermindert ist (Rotoli et al. 1982). In einer späteren detaillierten Arbeit wurden die CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen und die Zahl der LTCICs aus dem Knochenmark und dem peripheren Blut von Normalspendern und PNH-Patienten verglichen (Maciejewski et al. 1997). Darüber hinaus wurden die Zahlen der CFCs beider Personengruppen verglichen. Es zeigten sich bei allen gemessenen Parametern deutlich erniedrigte Werte bei Zellen aus dem Knochenmark und peripheren Blut von PNH-Patienten. Ein Vergleich der CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Population mit der CD34<sup>+</sup>CD59<sup>+</sup>-Population zeigte keine Unterschiede. Diese Resultate sprachen gegen einen intrinsischen Wachstumsvorteil der GPI-defizienten gegenüber den GPI-positiven Zellen. Es wurde vielmehr gezeigt, daß im Knochenmark von PNH-Patienten eine generelle Störung der Hämatopoese vorlag.

Eine Modell zum Studium humaner hämatopoetischer Erkrankungen besteht in der Transplantation humaner CD34<sup>+</sup>-Zellen in immundefekte Mäuse wie die SCID-hu-Maus (McCune et al. 1988). Transplantationen von CD34<sup>+</sup>-Zellen von PNH-Patienten in diese Mäuse zeigte eine langfristige Hämatopoese, die von den GPI-defizienten Zellen dominiert wurde (Iwamoto et al. 1996). Ganz im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die aus Tieren bestand, die mit CD34<sup>+</sup>-Zellen von normalen Spendern transplantiert wurden, fand bei den mit PNH-Zellen transplantierten Tieren sogar eine Hämatopoese statt, wenn die Tiere nicht intensiv mit humanen Zytokinen behandelt wurden. Die Autoren legten die Ergebnisse der Versuche so aus, daß die GPI-defizienten Zellen von PNH-Patienten einen intrinsischen Wachstumsvorteil hätten. Eine kontroverse Auslegung dieser Daten wurde von Bessler und Hillmen vorgenommen, indem sie behaupteten, daß diese

Ergebnisse die Theorie stützten, daß bestimmte äußere Bedingungen vorliegen müßten, die dem GPI-defizienten Klon erst einen Wachstumsvorteil verschaffen. Die Transplantation in ein Mausmodell würde diese äußeren Bedingungen erst schaffen, und dadurch würde der GPI-defiziente Klon die Hämatopoese dominieren (Bessler and Hillmen 1998).

Bei der aplastischen Anämie, die mit der PNH assoziiert sein kann, wurde Apoptose als der Mechanismus vermutet, der die Hämatopoese unterdrückt und zur Knochenmarkschädigung führt (Maciejewski et al. 1995, Young 1992). In zwei Arbeiten wurde überprüft, ob GPI-Defizienz einen Schutz vor Apoptoseinduktion bietet (Brodsky et al. 1997, Horikawa et al. 1997). Zelllinien, verschiedene Zellen aus dem peripheren Blut und CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem Knochenmark von PNH-Patienten wurden den verschiedenen Induktoren von Apoptose ausgesetzt. Diese Ergebnisse deuteten auf einen Schutz der GPI-defizienten Zellen gegenüber der Induktion von Apoptose hin. Eine andere kürzlich erschienene Arbeit hat die Korrelation der Apotoseresistenz mit der GPI-Defizienz widerlegt. Es wurde nicht ausgeschlossen, daß Apoptose eine Rolle bei der PNH spielt, aber es wurde belegt, daß ein anderer Mechanismus als die GPI-Defizienz für die Apoptose-assoziierte Pathogenese der PNH verantwortlich sein müßte (Ware et al. 1998).

Klinische und experimentelle Beobachtungen haben gezeigt, daß die Suppression der Hämatopoese und die damit in Verbindung stehende Induktion der zellvermittelten Apoptose die Folgen zellulärer immunologischer Mechanismen sind (Bacigalupo et al. 1988, Marsh et al. 1990, Schrezenmeier et al. 1993). Es ist durch zahlreiche Veröffentlichungen belegt, daß aus einer aplastischen Anämie sehr häufig eine PNH entstehen kann (Griscelli Bennaceur et al. 1995, Schrezenmeier et al. 1995, Schubert et al. 1994). Das Risiko für Patienten mit aplastischer Anämie, nach einer immunsupprimierenden Therapie an einer PNH zu erkranken, beträgt sieben Jahre nach Diagnosestellung 13 % (De Planque et al. 1989). Umgekehrt beträgt das Risiko eines Patienten mit PNH, an aplastischer Anämie zu erkranken, 58 % (Ware et al. 1991). Diese starken wechselseitigen Beziehungen zwischen den beiden Krankheiten belegen, daß beide Krankheiten Bedingungen schaffen oder nur in Bedingungen vorkommen, die auch die andere Krankheit begünstigen. Es wäre denkbar, daß, wenn eine Immunreaktion gegen das autologe Knochenmark besteht, die GPI-defizienten Zellen möglicherweise gerade durch das Fehlen bestimmter GPI-verankerter Moleküle diesem Mechanismus entkommen und daher ihren Wachstumsvorteil beziehen (Luzzatto et al. 1997).

Viele Gruppen haben sich mit Funktionen GPI-verankerter Oberflächenproteine befaßt, indem sie GPI-positive und -negative Zellen von PNH Patienten in ihrer Funktion verglichen. Es zeigte sich, daß diese Proteine einen Einfluß auf die Aktivierung und das Wachstum von Lymphozyten hatte (Presky et al. 1990, Schubert et al. 1992, Thomas et al. 1991, van den Berg et al. 1995). Eine vergleichbare Funktion GPI-verankerter Oberflächenproteine auf Stamm- und Vorläuferzellen konnte bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden.

Der Mechanismus der Hämolyse und der daraus resultierenden Anämie ist mittlerweile sehr gut untersucht und steht im Einklang mit den Beobachtungen, die man auf der biochemischen und molekulargenetischen Ebene gemacht hat. Die erhöhte Empfindlichkeit der Erythrozyten gegenüber dem autologen Komplement ist auf einen genetischen Defekt zurückzuführen. Die Ursache der venösen Thrombosen ist bislang nicht so eindeutig zuzuordnen, obwohl eine Veröffentlichung die Ursache in der Defizienz des Urokinase Plasminogen-Aktivators vermutet (Ploug et al. 1992). Es gibt zahlreiche Modelle, dennoch ist noch wenig bekannt, warum es zur Expansion des PNH-Klons, dem wahrscheinlich wichtigsten Schritt in der Pathogenese der PNH, kommt. Dieses mangelhafte Verständnis der Pathogenese macht es sehr schwer, gezielt therapeutisch zu intervenieren. So besteht die einzige tatsächlich heilende Therapie in einer Knochenmarktransplantation (Endo et al. 1996a, Graham et al. 1996, Kawahara et al. 1992). Ist dies wegen des Fehlens eines geeigneten Spenders nicht möglich, so besteht die Behandlung in der Transfusion von Thrombozyten und Erythrozyten und der Gabe von gerinnungshemmenden Mitteln. Es wurde auch gezeigt, daß eine immunsuppressive Behandlung mit Anti-Lymphozyten Globulin (ALG) oder Cyclosporin A (CsA) einen positiven Effekt auf den Verlauf der PNH hatte (Nakao et al. 1992, Paquette et al. 1997, Schubert et al. 1995, van Kamp et al. 1995). Auch zeigte die Gabe von Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) oder Erythropoetin (Epo) einen positiven Einfluß (Bourantas 1994, Ninomiya et al. 1993, Stebler et al. 1990). Auch eine Kombination von beidem (G-CSF und CsA) zeigte sehr gute Resultate (Schubert et al. 1997). So gut diese Therapien bei einzelnen Patienten zum Erfolg geführt haben und die Patienten keine wesentlichen Verschlimmerungen der Krankheit zeigten, wurden sie doch nicht geheilt, sondern der Verlauf nur verzögert. Darüber hinaus

war der Verlauf der Krankheit, auch unter Therapie, von Patient zu Patient sehr verschieden.

Nach dem heutigen Stand der Forschung ist es möglich, bestimmte Krankheiten gentherapeutisch zu behandeln. Klassischerweise kommen dafür Krankheiten in Frage, bei denen Patienten einen Stoffwechseldefekt haben, der sich auf ein bestimmtes inaktiviertes Gen zurückführen läßt. Ein solches Therapieprotokoll bestünde darin, dem Patienten Zellen zu entnehmen, diese ex vivo mit einem intakten Gegenstück zu dem defekten Gen, dem therapeutischen Gen, zu transduzieren und die Zellen anschließend zurück in den Patienten zu geben.

Es stellt sich die Frage, ob die PNH für eine gentherapeutische Behandlung in Frage kommt. Einige wichtige Voraussetzungen sind erfüllt. So gibt es bei der PNH einen definierten genetischen Defekt im *PIG-A* Gen. Aufgrund der verfügbaren Zellseparations-techniken ist es möglich, die betroffenen Zellen zu identifizieren und zu isolieren. Das Ziel für eine solche Therapie wäre die sich selbst erneuernde undifferenzierte hämatopoetische Stammzelle, die den GPI-Verankerungsdefekt trägt. Ein Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen wird idealerweise mit retroviralen Vektoren durchgeführt, da diese nicht nur effizient in der Transduktionrate sind, sondern sie integrieren auch stabil in das Genom der Wirtszelle und werden somit an alle nachfolgenden Zellgenerationen weitergegeben, wodurch eine stabile und dauerhafte Expression gewährleistet wäre. Rein technisch wäre es denkbar, die Voraussetzungen für eine somatische Gentherapie für die PNH zu schaffen.

Die Schwierigkeiten, eine PNH-Gentherapie durchzuführen, sind in der PNH selbst begründet. Es ist bisher noch zu wenig über die Pathogenese der PNH bekannt, um wirklich zu wissen, wie sich die GPI-defizienten Zellen nach Transduktion in ihrem Wachstum verhalten. In

Abbildung 4 ist der mögliche weitere Verlauf einer PNH nach Gentherapie dargestellt. Es sind zwei Möglichkeiten denkbar, wie sich die verschiedenen Zellpopulationen im Anschluß an eine Gentherapie verhalten. Ist der Wachstumsvorteil der GPI-defizienten Zellen von PNH-Patienten in dem Entkommen eines äußeren Selektionsdruckes begründet, so würde die Transduktion mit *PIG-A* die Zellen so verändern, daß sie in ihrem Wachstum gegenüber den GPI-defizienten wieder benachteiligt wären. Man würde auf diese Art nur eine leichte Verzögerung der Krankheit erreichen. Eine andere Möglichkeit

bestünde darin, daß der Wachstumsvorteil nur zufällig mit einer GPI-Defizienz assoziiert ist und die Zellen nach Transduktion keinen Nachteil im Vergleich zu den nicht-transduzierten GPI-defizienten Zellen haben. Die GPI-positiven transduzierten Zellen würden die Hämatopoese dominieren, die GPI-defizienten Zellen würden in den Hintergrund treten und es käme nicht mehr zum Auftreten einer PNH.

Bevor es zur klinischen Anwendung einer *PIG-A* Gentherapie für die PNH kommen kann, müßte anhand von Modellen im Vorfeld noch die Frage beantwortet werden, ob eine solche Gentherapie möglich und sinnvoll ist.

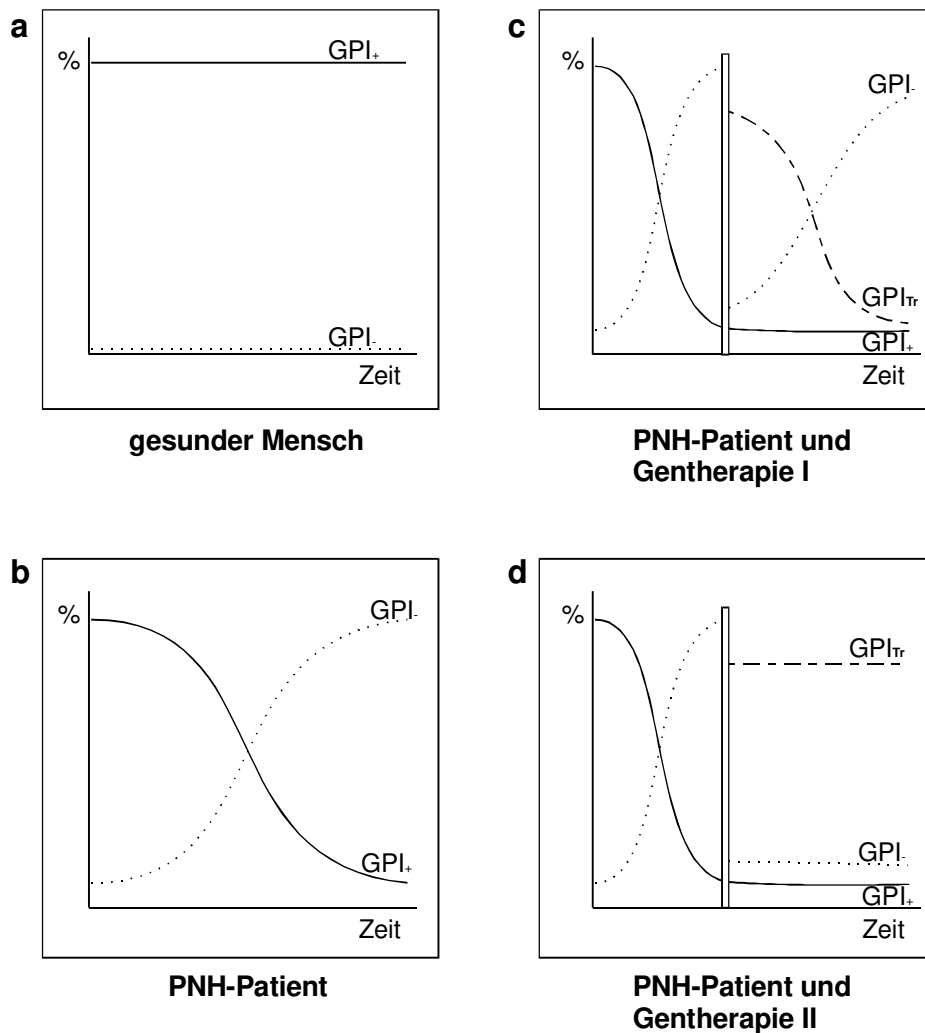


Abbildung 4: Wachstum von GPI<sup>-</sup> im Vergleich zu GPI<sup>+</sup>-Zellen

Bei einem gesunden Menschen (a) können GPI-defiziente Zellen persistieren. Da ihre Zahl nicht zunimmt, kommt es auch nicht zur Ausbildung einer PNH (b). Die beiden Diagramme c und d zeigen einen möglichen Verlauf der Anteile der verschiedenen Zelltypen nach einer *PIG-A* Gentherapie (senkrechter Balken). Es wäre möglich, daß der GPI-defiziente Klon weiterhin einen Wachstumsvorteil auch gegenüber der transduzierten Zellen ( $\text{GPI}^{\text{Tr}}$ ) besitzt (c). Vielleicht wird der Wachstumsvorteil der Zellen nach Transduktion beibehalten, so daß die transduzierte Zellpopulation in ihrer Größe stabil bleibt, nur daß sie nicht mehr GPI-defizient ist.

## 1.2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte ein Teilaspekt der Fragestellung beantwortet werden, ob eine *PIG-A* Gentherapie möglich ist. Die technischen Voraussetzungen sollten im Rahmen dieses Projektes geschaffen werden. D. h., in Anlehnung an bestehende Protokolle sollten Bedingungen geschaffen und optimiert werden, die einen effizienten *PIG-A* Gentransfer in GPI-defiziente hämatopoetische Vorläuferzellen von Patienten mit PNH ermöglichen. Retrovirale Vektoren sollten kloniert werden, die das *PIG-A* Gen stabil exprimieren. Hierzu mußten erst Testsysteme etabliert werden, mit welchen es möglich ist, diese Expression zu detektieren. Es galt, ein geeignetes Zellkultursystem zu entwickeln, welches es ermöglichte, hämatopoetische Zellen zu kultivieren, so daß diese sich mit Retroviren infizieren ließen. Dieses Protokoll sollte in weitergehenden Untersuchungen angewendet werden können, so daß differenzierte Studien möglich sind, die die Frage beantworten, ob ein *PIG-A* Gentherapie für die PNH möglich und sinnvoll ist. Möglicherweise könnte ein solches Protokoll auch in einer klinischen Therapie zur Anwendung kommen.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

Hela (ATCC)

Humanes Adenokarzinom (Cervix) (Chen 1988)

NIH/3T3 (ATCC)

Murine embryonale Fibroblastenlinie (Jainchill et al. 1969)

Jurkat E.6-1 (ATCC)

Humane akute T-Zell Leukämie Linie (Gillis and Watson 1980) (Weiss et al. 1984)

Jurkat Klone 1, 2, 7

Durch *in vitro* Mutagenese generierte Varianten von Jurkat E.6-1. Diese Klone haben einen Defekt in der Expression GPI-verankerter Oberflächenmoleküle (von Marcel Deckert, Nizza zur Verfügung gestellt).

GP+E86 (ATCC)

Ecotrope murine retrovirale Verpackungszelllinie (Markowitz et al. 1988b).

GP+envAm12 (ATCC)

Amphotrope murine retrovirale Verpackungszelllinie (Markowitz et al. 1988a).

PA317 (ATCC)

Amphotrope murine retrovirale Verpackungszelllinie (Miller and Buttimore 1986, Rosenberg et al. 1990).

PG13 (ATCC)

Mit dem Gibbonaffen-Leukämievirus pseudotypisierte murine retrovirale Verpackungszelllinie (Miller et al. 1991, Miller and Rosman 1989).



## 2.1.2 Bakterienstämme

HB101 (ATCC) (Boyer and Roulland-Dussoix 1969, Maniatis et al. 1982)

*F<sup>-</sup> D(gpt-proA)62 leuB6 supE44 ara-14 galK2 lacY1 D(mcrC-mrr) rpsL20 (Str<sup>r</sup>) xyl-5 mtl-1 recA13*

JM109 (Clontech) (Yanisch-Perron et al. 1985)

*F<sup>-</sup> DtraD36 lacI<sup>f</sup> D(lacZ)M15 proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>/e14<sup>-</sup>(mcrA<sup>-</sup>) D(lac-proAB) thi gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) relA1 supE44 recA1*

XL1-Blue (Stratagene)

*F<sup>-</sup> ::Tn10proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>f</sup> D(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) thi hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 relA1 lac*

## 2.1.3 Chemikalien

Die verwendeten Feinchemikalien hatten im allgemeinen Analysegrad und wurde in den meisten Fällen von Applichem, Merck, Riedel-de Haën, Sigma und T. J. Baker bezogen. Destilliertes Wasser und deionisiertes Wasser wurde in der MHH hergestellt. Wenn die Herkunft von Chemikalien wichtig für die Durchführung eines Experimentes war, so wurde dies an entsprechender Stelle vermerkt.

### 2.1.3.1 Plasmide

pBluescript KS(+) (pBS), Stratagene

pGEM-T Vektor ,Promega (#A3600); Klonierungsvektor mit überhängenden T, der zum Klonieren von PCR-Amplifikaten diente.

pGEM-11Zf(+), Promega (#P2411); Klonierungsvektor der Firma Promega.

pLXSN; Retroviraler Klonierungs- und Expressionsvektor von A. D. Miller (Miller and Rosman 1989).

pLXPXSN; Retroviraler Klonierungs- und Expressionsvektor von W. F. Anderson (nicht publiziert).

pSF31N; Retroviraler Klonierungsvektor von C. Baum, der vor dem Neomycin-Resistenzgen eine *multi-cloning-site* hat.

pTO5; Plasmid, das die *PIG-A* cDNA enthält (Ostendorf 1995).

### 2.1.3.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert. Die lyophilisierten Primer wurden mit einer Konzentration von 100 µg/ml gelöst, aliquotiert und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

| Name      | Sequenz (5'→3')                 |
|-----------|---------------------------------|
| PigANot1  | GCGGCCGCCATGGCCTGTAGAGGAGGAGC   |
| PigABamH1 | GGATCCTACTACCTGGTTTCAGATATCTC   |
| Kpn 60    | GGGGTACCAGAACTGATGTCTAAACCG     |
| PIGARIGH  | CCGTCGCTCGAGTCTTACAATCTAGGCTTCC |
| PIGALEFT  | CAGCGACTCGAGAACTGATGTCTAAACCG   |
| PIG RTAS  | AATGATATAGAGGTAGCATAAC          |
| PIGAEX2F  | GAGCTGAGATCCTGTTTTACTCT         |
| PIGAEX2R  | GCCAAACAATCATTATATACAAG         |
| PIGAEX3F  | TGGATTCTCAGTCGTTCTGGTGA         |
| PIGAEX3R  | CTTCTCCCTCAAGACAACATGAA         |
| SEQ1      | CTTTCAGAGGCAAGTAATAGAC          |
| SEQ2      | GCTCTCTCAGTGCCTGATTGAA          |
| SEQ3      | ACCAGCTGCATGACAGGGTGCG          |
| SEQ4      | TGTGTGAAGGATTGGAAAAGGC          |
| SEQ5      | CAGTAACAGGCTACATCTTTGC          |
| 491       | CATGATGCTCTCTTCCACCCCA          |
| 691       | AGTGTCCGTCATTCCTAATGC           |

### 2.1.3.3 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

| Antikörper                  | Klon       | Isotyp                   | Konjugat      | Hersteller        |
|-----------------------------|------------|--------------------------|---------------|-------------------|
| CD3                         | UCHT1      | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | PE, unkonj.   | Dako              |
| CD3                         | OKT3       | IgG <sub>2a</sub> (Maus) | unkonj.       | Ortho Diagnostics |
| CD4 (Leu-3a)                | SK3        | IgG <sub>1</sub> (Maus)  |               | BD                |
| CD8                         | B9.11      | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | FITC          | Immunotech        |
| CD28                        | IOT28      |                          | unkonj.       | Immunotech        |
| CD34, Klasse II (HPCA-2)    | 8G12       | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | FITC, PE      | BD                |
| CD34 Klasse III             | 581        | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | FITC, PE, Cy5 | Immunotech        |
| CD38 (Leu-17)               | HB-7       | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | PE            | BD                |
| CD38                        | T16        | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | PE            | Immunotech        |
| CD45 (Anti-HLe-1)           | 2D1        | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | PerCP         | BD                |
| CD48                        | MEM102     | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | unkonj.       | Dianova           |
| CD52 (Campath-1)            | YTH66.9HL  | IgM (Ratte)              | FITC          | Serotech          |
| CD55 (Anti-human-DAF)       | IA10       | IgG <sub>2a</sub> (Maus) | PE            | Pharmingen        |
| CD55                        | BRIC 110   | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | unkonj.       | IBGRL             |
| CD59                        | p282 (H19) | IgG <sub>2a</sub> (Maus) | FITC          | Pharmingen        |
| CD59                        | MEM43      | IgG <sub>2a</sub> (Maus) | unkonj.       | Dianova           |
| CD95 (Anti-human Fas)       | G254-274   | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | unkonj.       | Pharmingen        |
| p-Glycoprotein (MDR-1)      | UIC-1      | IgG <sub>2a</sub> (Maus) | unkonj.       | Immunotech        |
| Anti-human MHC ABC          | W6/32      | Klasse 1                 |               |                   |
| Isotypkontrollen            | 107.3      | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | PE            | Pharmingen        |
|                             | X39        | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | FITC, PE      | BD                |
|                             | 679.1Mc7   | IgG <sub>1</sub> (Maus)  | Cy5           | Immunotech        |
| Ziege Anti-Maus IgG+M (H+L) | Antiserum  |                          | DTAF, PE      | Dianova           |
| Propidiumiodid              |            |                          |               | Pharmingen        |
| 7-AAD                       |            |                          |               | Pharmingen        |
| Annexin-V                   |            |                          | PE            | Pharmingen        |
| Rhodamin 123                |            |                          |               | Sigma             |

#### 2.1.3.4 Zytokine und Wachstumsfaktoren

| Faktor         | Typ               | Hersteller          |
|----------------|-------------------|---------------------|
| Interleukin-3  | rekombinant human | PeproTech           |
| Interleukin-6  | rekombinant human | PeproTech           |
| Interleukin-11 | rekombinant human | PeproTech           |
| SDF1- $\alpha$ | rekombinant human | PeproTech           |
| Thrombopoetin  | rekombinant human | PeproTech           |
| GM-CSF         | rekombinant human | PeproTech           |
| G-CSF          | rekombinant human | Amgen               |
| Erythropoetin  | rekombinant human | Boehringer Mannheim |
| SCF            | rekombinant human | Amgen, PeproTech    |
| Flt3-Ligand    | rekombinant human | Immunex             |

#### 2.1.3.5 Größenstandards

1kb-Leiter (100 $\mu$ g/ml in 1 x SB), Gibco BRL (#15615-024) mit Fragmentgrößen 12.216, 11.198, 10.180, 9.162, 8.144, 7.126, 6.108, 5.090, 4.072, 3.054, 2.036, 1.636, 1.018, 517/506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75 bp

100 bp-Leiter (100 $\mu$ g/ml in 1 x SB), Gibco BRL (#15628-019) mit Fragmentgrößen 2072, 1.500, 1.400, 1.300, 1.200, 1.100, 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp

Lambda DNA/HindIII (100  $\mu$ g/ml in 1 x SB), MBI Fermentas (#SM0101) mit Fragmentgrößen 23.130, 9.416, 6.5574.361, 2.322, 2.027, 564 bp

#### 2.1.3.6 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen GIBCO BRL, Boehringer Mannheim, MBI Fermentas, New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Sigma, Serva und Stratagene bezogen. War die Herkunft eines dieser Enzyme für das Protokoll entscheidend, so wurde dies an entsprechender Stelle vermerkt.

## 2.1.4 Stammlösungen und Medien

### 2.1.4.1 Standardpuffer

|                       |  |
|-----------------------|--|
| TAE 50 x Puffer (1 L) | 242 g Tris Base<br>57,1 ml Eisessig<br>100 ml 0,56 M EDTA, pH 8,0<br>Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt und mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 1 Liter aufgefüllt. |
| TBE 10 x Puffer (1 L) | 107,80 g Tris Base<br>55 g Borsäure<br>10 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0<br>Die Lösung wurde mit Aqua dest. auf 1 Liter aufgefüllt.   |
| TE                    | 1 mM EDTA<br>10 mM Tris-HCl, pH 8,0  |
| 6 x SB (50 ml)        | 6 ml 50 x TAE Puffer<br>44 ml Glycerin<br>Anschließend wurde eine kleine Spatelspitze Bromphenolblau dazugegeben und die Lösung gut gemischt.                            |
| Ethidiumbromid        | 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O   |

### 2.1.4.2 Lösungen und Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen

Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS), Apotheke MHH  
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS), Apotheke MHH  
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) ohne Calcium und Magnesium, Gibco BRL (#14190)  
RPMI1640, Biochrom (#F1215)  
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Gibco BRL (#41965-039)  
Iscove's modified Dulbecco's Medium, Gibco BRL (#2198-024)

Iscove's modified Dulbecco's Medium, 2 % Fötales Kälber Serum, CellSystems (#HBM-3160)

Ficoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml), Biochrom (#L6115)

L-Glutamin 200 mM, Biochrom (#K0282)

Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml), Biochrom (#A2213)

Trypsin/EDTA, PAA (#L11-004)

Seren                      Fötales Kälberserum (Standard-FCS), PAA (#A15-773)  
Costar FCS ,Cytogen (#01-01500)  
HyClone FCS, Greiner (#A-1115-L)  
Pferdeserum, Biochrom (#S9135)

Dulbecco's modified Eagle's medium für Verpackungszellen (DMEM-VP)

Dulbecco's modified Eagle's medium

10 % (v/v) Costar FCS

2 mM L-Glutamin

100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

HAT-Medium              DMEM-VP  
0,2 % (v/v) 500 X HAT, Boehringer Mannheim (#644579)

HXM-Medium (100 ml) DMEM-VP  
150 µl Hypoxanthin (10 mg/ml in 0,1 N NaOH, Sigma #H9377)  
2,5 ml Xanthin (10 mg/ml in 0,1 N NaOH, Sigma #X7375)  
250 µl Mycophenolsäure (10 mg/ml in 0,1 N NaOH, Sigma #M5255)  
Zur Erniedrigung des pH-Wertes wurden ca. 20 - 30 µl konzentrierte HCl dazugeben.

Stammzellmedium        Iscove's modified Dulbecco's Medium  
10 % (v/v) FCS (Hyclone)  
10 % (v/v) Pferdeserum  
100 µl 1 mM Hydrocortison  
2 mM L-Glutamin  
100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

### 2.1.4.3 Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

#### Luria-Bertani Medium, 1 L

10 g Bacto trypton (Difco)

5 g Hefextrakt (Difco)

5 g NaCl

Mit Aqua dest. wurde das Medium auf ca. 900 ml aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde das Volumen auf 1 L eingestellt und das Medium autoklaviert.

#### Terrific Broth, 1 L

12 g Bacto trypton (Difco)

24 g Hefextrakt (Difco)

4 ml Glycerin

Das Medium wurde auf 900 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und autoklaviert. Vor Gebrauch wurden dem Medium 100 ml sterilfiltrierter TB-Phosphatpuffer zugesetzt (0,17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

#### LB-Agar-Platten, 1 L

10 g Bacto trypton (Difco)

5 g Hefextrakt (Difco)

5 g NaCl

15 g Agar

Mit Aqua dest. wurde das Medium auf ca. 900 ml aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde das Volumen auf 1 L aufgefüllt und das Medium autoklaviert. Das Medium wurde bis zu einer Temperatur von ca. 50 °C abgekühlt, dann wurden die Zusatzstoffe dazugegeben und die Platten gegossen. Die Platten blieben bis zum Erstarren geöffnet unter der Sterilbank.

#### LB/Amp/X-Gal/IPTG-Platten

LB-Agar wurde kurz vor dem Erstarren, d. h., wenn der Agar eine Temperatur von etwa 40 - 50 °C hatte, mit den folgenden Substanzen versetzt (die Menge bezieht sich auf 300 ml Agar):

60 µl Ampicillin (Stammlösung: 50 mg/ml)

1,5 ml 0,1 M IPTG  
240 µl X-Gal-Lösung (50 mg/ml in Dimethylformamid)  
Die Platten wurden im Dunkeln gelagert und konnten ca.  
3 Monate verwendet werden.

TSS  
LB-Medium (pH-Wert nicht eingestellt)  
30 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 % (v/v) Polyethylenglykol 4000  
5 % (v/v) DMSO  
Das Medium wurde autoklaviert und bis zur Verwendung bei 4 °C  
aufbewahrt.

#### 2.1.4.4 Lösungen für die Transfektion eukaryotischer Zellen

1,25 x HBS  
172 mM NaCl  
6,25 mM KCl  
0,88 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,125 % Glucose  
50 mM HEPES  
7,8 µg/ml Fisch-Sperm DNA  
Der pH-Wert wurde bei RT auf 7,05 eingestellt, mit 0,22 µm-Filter  
sterilfiltriert und bei -20 °C aufbewahrt. Direkt vor Gebrauch  
wurde die Lösung auf RT erwärmt.

2,5 M CaCl<sub>2</sub>  
Die Lösung wurde mit 0,22 µm sterilfiltriert und bei 4 °C aufbe-  
wahrt.

#### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

|  |         |
|--|---------|
| Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> Filtertop) | Greiner |
| Zellkulturplatten (8 cm, 4 cm gerastert)   | Falcon  |



---

|  |   |
|--|---|
| Multiwell-Platten (6-, 24-, 96-Loch-Platten) | Costar, Corning, Nunc,<br>Falcon, Greiner |
| Reaktionsgefäße (50 ml, 15 ml)               | Greiner                                   |
| Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)       | Sarstedt, Eppendorf                       |
| Pipetten                                     | Greiner                                   |
| Einfriergefäße                               | Nunc                                      |
| Pipettenspitzen                              | Sarstedt                                  |
| Spritzen                                     | B. Braun                                  |
| Kanülen                                      | B. Braun                                  |

## 2.1.6 Geräte

---

|                                    |                               |                  |
|------------------------------------|-------------------------------|------------------|
| Photometer,                        | Shimadzu UV-1202              |                  |
| Ultrazentrifuge                    | Beckmann, Modell L7-55        | Rotor Ti 70/1    |
| Zentrifuge                         | Beckmann, Modell J2-21        | Rotor JA14, JA17 |
| Tischzentrifugen                   | Heraeus, Modell Biofuge 13    |                  |
|                                    | Heraeus, Modell Megafuge 2.0R |                  |
| Thermocycler                       | Landgraf, Modell Varius V45   |                  |
| Zellkulturbrutschränke             | Heraeus,                      |                  |
| Elektroporationsapparatur          | Eurogentec                    |                  |
| Horizontalgelelektrophoresekammern | Bio-Rad; Pharmacia,           |                  |
| Heizblock                          | Eppendorf, Modell 5436        |                  |
| Inkubationsschüttler               | New brunswick Scientific      |                  |
| Spannungsgeräte                    | Pharmacia                     |                  |
| Vakuumofen                         | Heraeus                       |                  |
| Vakuumzentrifuge                   | Savant Instruments            |                  |
| Sterilbank                         | Gelaire                       |                  |

---

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Die *E. coli*-Stämme wurden auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden bis zu 6 Wochen bei 4 °C aufbewahrt.

Für Plasmidpräparationen wurden 3 ml LB-Medium mit 20 µl einer *E. coli*-Glycerolkultur oder einer Kolonie von einer Stammplatte beimpft und über Nacht im Rotationsschüttler bei 37 °C und 200 Upm. inkubiert.

Für Dauerkulturen wurde entweder eine Übernachtskultur mit einem gleichen Volumen LB-Medium mit 30 % Glycerin gemischt und bei -80 °C aufbewahrt oder sie wurden als Stabkulturen bei Raumtemperatur gelagert.

#### 2.2.1.2 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation extrachromosomaler DNA in die hier verwendeten *E. coli*-Stämme wurden die Bakterien neben der Standard  $\text{CaCl}_2$ -Methode mit der TSS-Methode (Chung et al. 1989) kompetent gemacht.

#### 2.2.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

Als Vorkultur wurden 5 ml LB-Medium mit 20 µl einer *E. coli*-Glycerolkultur oder einer Kolonie von einer Stammplatte beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 40 ml LB-Medium wurden mit 500 µl der Vorkultur angeimpft und bis zu einer  $\text{OD}_{600}=0,4$  weiter geschüttelt, dann auf Eis abgekühlt und pelletiert (2.000 Upm., 10 Min., 4 °C). Das Zellsediment wurde in 4 ml eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. 100 bis 200 µl-Portionen wurden in sterilen Eppendorfgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

#### **2.2.1.4 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA**

Etwa 50 ng Plasmid DNA oder 5 bis 10 µl eines Ligationsansatzes wurden mit 50 bis 100 µl der kompetenten E. coli gemischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 Sek. wurden die Bakterien für 3 Min. auf Eis abgekühlt und anschließend in 800 µl LB-Medium bei 37 °C für 45 Min. geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde auf Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert, die bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden.

### **2.2.2 Zellkultur**

#### **2.2.2.1 Allgemeine Zellkultur**

Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre steril inkubiert. Die Zellen wurden normalerweise zweimal wöchentlich passagiert. Suspensionszellen wurden gezählt und auf einen Titer von 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Bei adhärenenten Zellen wurde die Dichte mikroskopisch begutachtet, die Zellen dann abtrypsinisiert und so eingestellt, daß sie zur nächsten Passage gerade konfluent waren.

##### *2.2.2.1.1 Titerbestimmung*

Adhärenente Zellen wurden abtrypsinisiert; Suspensionszellen konnten direkt nach starkem Auf- und Niederpipettieren gezählt werden. Die Zellsuspension wurde mit einem gleichen Volumen einer 1:10 verdünnten Trypanblau-Lösung (Sigma, #T8154) gemischt und in der Neubauer-Zählkammer mindestens 100 ungefärbte Zellen ausgezählt.

##### *2.2.2.1.2 Einfrieren*

Je 2 x 10<sup>7</sup> Zellen aus der Suspensionskultur oder abtrypsinisierte Zellen einer 75 cm<sup>2</sup> konfluenten Zellkulturflasche wurden 5 Min. bei 1.400 Upm. zentrifugiert, in 1 ml kaltem FCS mit 10 % DMSO (Sigma, #D 2650) resuspendiert und in vorgekühlte sterile Einfriereröhr-

chen gefüllt, die in einer Pappschachtel sofort in -80 °C überführt wurden. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen zur längerfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff gebracht.

#### *2.2.2.1.3 Auftauen*

Die in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Zellen wurden schnell aufgetaut, in ein Röhrchen mit 10 ml Kulturmedium überführt und 5 Min. bei 1.400 Upm. zentrifugiert. Um Reste des zelltoxischen DMSOs zu entfernen, wurde das Zellpellet in 14 ml Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann auf 2 bis 4 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml Kulturmedium eingestellt.

#### **2.2.2.2 Durchflußzytometrische Analysen**

Für die Durchflußzytometrie wurden je Färbung in der Regel 10<sup>5</sup> Zellen eingesetzt. Die Ansätze wurden in einer 96-Loch-Platte mit PBS/BSA/NaN<sub>3</sub> gewaschen. Die Fc-Rezeptoren wurden mit 50 µl humanem Immunglobulin (Endobulin, Immuno) blockiert. Anschließend wurde der Antikörper nach Herstellerangabe dazugegeben und für etwa 20 Min. bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS/BSA/NaN<sub>3</sub> gewaschen und gegebenenfalls mit einem Fluorochrom-konjugierten sekundären Antikörper für weitere 20 Min. bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden wieder mit PBS/BSA/NaN<sub>3</sub> gewaschen und anschließend in 50 µl PBS/BSA/NaN<sub>3</sub> resuspendiert.

Als Kontrollen wurden Zellen nur mit Medium, mit Antikörperisotypkontrollen und bei humanen Zellen mit W6/32 als Positivkontrolle inkubiert.

Die Messungen wurden im FACScan und FACScalibur Cytometer von Becton Dickinson durchgeführt. Mit dem FACScan wurde die Messungen für Ein- oder Zweifarbenfluoreszenzen mit Consort 30 und für Dreifarbenfluoreszenzen mit Facscan durchgeführt. Die Messungen mit dem FACScalibur wurden mit der CellQuest Software durchgeführt. Die Auswertungen der Messungen wurden entweder direkt mit diesen Programmen oder auf dem PC mit WinMDI durchgeführt.

#### *2.2.2.2.1 Rhodamine-Exclusion-Assay*

Dieses Protokoll diente zur Bestimmung der Aktivität des P-Glycoproteins in mit MDR1-Gen-transduzierten Zellen. Ein Tag vor der Messung wurde das Medium der Zellen gewechselt. Für die Messung wurden die Zellen ggf. abtrypsinisiert und dann zweimal in HFN (HBSS, 2 % (v/v) FCS, 0,1 % (w/v)  $\text{NaN}_3$ ) gewaschen.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden in 1 ml HFN mit 100 ng/ml Rhodamin-123 aufgenommen und für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit HFN gewaschen und direkt im FACS auf FL-1 gemessen. Die Zellen ohne P-Glycoproteinaktivität sollten ein positives Signal geben, die mit P-Glycoprotein sollten nicht mit Rhodamin-123 gefärbt sein.

#### **2.2.2.3 Zellseparation**

##### *2.2.2.3.1 Anreicherung mononukleärer Zellen im Dichtegradienten*

Knochenmark oder Vollblut wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit einem halben bis einem Volumen Ficoll-Lösung sehr vorsichtig unterschichtet, so daß in der Flüssigkeit keine Verwirbelungen entstanden. Die Röhrchen wurden anschließend in der Zellzentrifuge bei 2.000 Upm. 20 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Die mononukleären Zellen, die sich nun in der Interphase der beiden Flüssigkeiten befanden, wurden vorsichtig abgenommen und in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit HBSS gewaschen, um das restliche Ficoll zu entfernen. Falls sich zu diesem Zeitpunkt noch viele Markpartikel in der Suspension befanden, wurde diese 20 Min. mit 0,1 % (w/v) Collagenase B (Boehringer Mannheim, #1088 815) bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Lyse der restlichen Erythrozyten wurde das Zellpellet dann in sterilem destilliertem Wasser aufgenommen. Nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde ein Volumen 1,8 % (w/v) NaCl-Lösung dazugegeben, damit die Lösung wieder eine physiologische Osmolarität hatte. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS wurden die Zellen gezählt und konnten für weitere Versuche verwendet werden.

#### 2.2.2.3.2 Isolierung von CD34<sup>+</sup> frühen Progenitoren mit MACS

Gefrorene Zellen wurden schnell aufgetaut und zweimal mit 10 ml PBS/0,5 % BSA gewaschen, oder es wurden direkt angereicherte mononukleäre Zellen genommen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml PBS/0,5 % BSA mit 100 U DNase I (Boehringer Mannheim, #1284 932) resuspendiert und 5 - 10 Min. bei Raumtemperatur auf dem Rotationsmischer inkubiert.

Die Zellen wurden dann mit 10 ml PBS/0,5 % BSA gewaschen, und die gut sichtbaren Zellklumpen wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig entfernt. Die Suspension wurde zentrifugiert und das Pellet in 300 µl PBS/0,5 % BSA (für bis zu 10<sup>8</sup> Zellen) resuspendiert. Zu der Suspension wurden 100 µl Reagenz A1 '*blocking reagent*' (für bis zu 10<sup>8</sup> Zellen) und 100 µl Reagenz A2 '*antibody reagent*' (für bis zu 10<sup>8</sup> Zellen) hinzugefügt und 15 Min. bei 4 - 8 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml PBS/0,5 % BSA gewaschen und der Puffer komplett entfernt. Die Zellen wurden dann vorsichtig in 400 µl PBS/0,5 % BSA resuspendiert, 100 µl Reagenz B (*magnetic beads*) dazupipettiert, vorsichtig gemischt und 15 Min. im Kühlschrank inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 5 ml PBS/0,5 % BSA hinzugefügt (für bis zu 10<sup>8</sup> Zellen). Falls sich Zellklumpen in der Suspension befanden, wurden diese durch ein 70 µm Netz (Falcon, #2350) filtriert (wenn mehr als 10<sup>8</sup> Zellen eingesetzt wurden, mußte die Suspension immer filtriert werden). Die Zellen wurden danach 5 Min. bei 1.500 Upm. abzentrifugiert. Während dieser Zeit wurde eine MACS MS<sup>+</sup>-Säule (Miltenyi, #422-01) in den Vario-MACS-Magneten eingespannt und durch zweimaliges Waschen mit 500 µl PBS/0,5 % BSA equilibriert. Das Zellpellet wurde nach der Zentrifugation in 500 µl PBS/0,5 % BSA vollständig resuspendiert und auf die, in den Magneten eingespannte, Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend dreimal mit 500 µl PBS/0,5 % BSA gewaschen. Dann wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die CD34<sup>+</sup> angereicherten Zellen mit 500 µl PBS/0,5 % BSA unter Zuhilfenahme des Stempels zügig in ein steriles 5 ml Gefäß ausgewaschen.

Üblicherweise hatte diese Fraktion einen Anteil von 80 - 90 % CD34<sup>+</sup>-Zellen. Um den Anteil der CD34<sup>+</sup>-Zellen weiter zu erhöhen, wurde eine weitere Säule vorbereitet und die bereits angereicherten Zellen nochmals durch die Säule angereichert. So wurden CD34<sup>+</sup>-Anteile von 95 - 99 % erzielt. Der Erfolg dieser positiven Selektion konnte mittels FACS-

Analyse verfolgt werden. Die gebundenen Antikörper und magnetischen Partikel haben keine negativen Auswirkungen auf die Weiterkultivierung der Zellen (Abts et al. 1989).

Um das Resultat der Separation zu bestimmen, wurden die Zellen nach der Separation mit einem CD34 mAk markiert. Es war hierbei wichtig, einen anderen als einen Klasse-I-Antikörper zu verwenden. Im allgemeinen wurde der Klon 581 oder HPCA-2 verwendet.

Die Reagentien A1, A2 und B entstammten aus dem 'CD34 Progenitor Cell Isolation Kit' (Miltenyi, #467-01).

#### *2.2.2.3.3 Isolierung von $CD34^{+}CD59^{-}$ frühen Progenitoren mit MACS Multisort*

Diese Methode ähnelt der oben beschriebenen CD34-Zellanreicherung. Die Lösungen für dieses Protokoll entstammten dem 'CD34 Multisort Kit' (Miltenyi, #567-01) oder dem 'Large Scale CD34 Multisort Kit' (Miltenyi, # 567-02). Das Protokoll ist identisch mit der oben beschriebenen Methode mit dem Unterschied, daß hier nach der Blockierung mit dem *blocking reagent* (Miltenyi, # 599-01) die Zellen direkt mit *CD34-microbeads* inkubiert wurden. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen indirekten Anreicherung wurden in diesem Fall die magnetischen Partikel direkt auf die Zellen gebracht. Nachfolgend sind die für dieses Protokoll zusätzlich durchzuführenden Schritte aufgeführt:

Die angereicherten  $CD34^{+}$ -Zellen wurden abzentrifugiert und in 500 µl PBS/0,5 % BSA resuspendiert und mit 20 µl 'release reagent' für 10 Min. bei 4 °C inkubiert.

Zum Entfernen der *beads* wurde die Zellsuspension auf eine mit PBS/0,5 % BSA gewaschene magnetische Säule geben. Die durchgelaufenen Zellen wurden gewaschen und in 50 µl/10<sup>7</sup> Zellen PBS/0,5 % BSA resuspendiert und 30 µl Stop-Solution dazugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit 20 µl CD59-FITC Antikörpern 30 Min. bei 4 °C inkubiert.

Die Zellen wurden gewaschen und das Pellet in 90 µl/10<sup>7</sup> Zellen PBS/0,5 % BSA aufgenommen und mit 10 µl anti-FITC *Microbeads* (Miltenyi, #487-01) 15 Min. bei 4 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Suspension gewaschen und auf eine vorbereitete Säule gegeben. Die durchgelaufene Fraktion enthielt die CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen.

Äquivalent zu diesem Protokoll wurden so auch CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>-Zellen angereichert, nur daß anstelle des CD59 der CD38 mAk verwendet wurde.

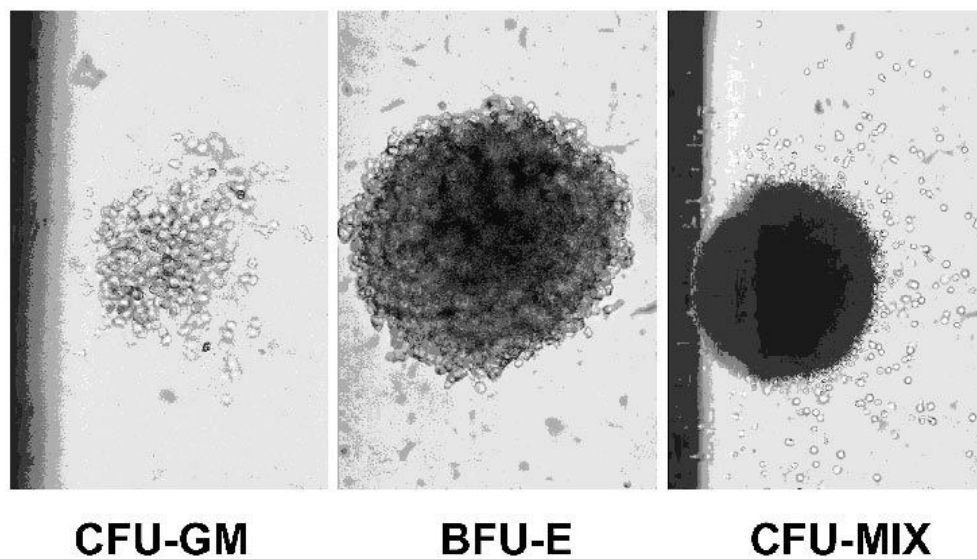
Zur Aufreinigung größerer Zellmengen wurden die VS<sup>+</sup> Säulen (Miltenyi, #413-06) verwendet. Diese Säulen wurden mit 5 ml PBS/0,5 % BSA gewaschen und dann bis zu  $2 \times 10^8$  Zellen in 5 ml PBS/0,5 % BSA auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule dreimal mit 3 ml PBS/0,5 % BSA gewaschen und die Zellen dann unter Zuhilfenahme des Stempels mit 5 ml PBS/0,5 % BSA eluiert.

#### **2.2.2.4 Quantifizierung hämatopoetischer Vorläuferzellen im *Colony-Formation-Assay***

Die Quantifizierung hämatopoetischer Vorläuferzellen wurde durch Zytokin-induzierte Differenzierung unreifer hämatopoetischer Vorläuferzellen in einem semisoliden Methylcellulosemedium ermittelt (Testa and Molineux 1993). Hierzu wurden zu 3 ml Methylcellulosemedium 300 µl Zellsuspension gegeben, die  $3 \times 10^3$  CD34<sup>+</sup>-Zellen enthielt. Das Medium mit den Zellen wurde anschließend gevortext und so lange bei Raumtemperatur stehengelassen, bis die Luftblasen nach oben gestiegen sind. Das Medium wurde dann mit einer Spritze mit breiter stumpfer Kanüle aufgezogen und jeweils 1,1 ml auf zwei 35 mm gerasterte Zellkulturschalen gegeben, so daß auf jeder Schale  $10^3$  Zellen waren. Diese zwei Schalen und eine weiter geöffnete und mit Wasser gefüllte Schale wurden in eine 80 mm Zellkulturschale gestellt und 12 - 16 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die entstandenen Kolonien nach verschiedenen Kolonietypen mikroskopisch ausgezählt. Das Auszählen der Kolonien wurde etwas vereinfacht, indem Kolonien ähnlichen Zelltyps zu einem Kolonietyp zugeordnet wurden. Hier wurden BFU-E und CFU-E als BFU-E zusammengefaßt. Genauso wurden die Kolonietypen CFU-G, CFU-M und CFU-GM als CFU-GM zusammengefaßt. Kolonien, die sowohl Erythrozytenvorläufer als auch myeloide Vorläufer enthielten, wurden als CFU-Mix bezeichnet. CFU-GM Kolonien wurden nur dann als Kolonie gewertet, wenn sie aus mindestens 40 - 50 Zellen bestanden. Enthielt sie darüber hinaus noch erythroide Cluster, wurde sie als CFU-Mix bezeichnet. Als BFU-E wurden die in Clustern



vorliegenden rotgefärbten Zellen bezeichnet (Abbildung 5). Hierbei wurden isolierte Cluster als eine Kolonie gewertet und mehrere eng zusammenliegende Cluster ebenfalls als eine Kolonie. Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei verschiedenen Methylcellulosemedien verwendet, die sich in der Zahl und der Zusammensetzung der erhaltenen Kolonien sowie in der Reproduzierbarkeit unterschieden. Die Zusammensetzung ist im folgenden zusammengefaßt:



**Abbildung 5: Darstellung der ausgewerteten Kolonietypen**

**Selbsthergestelltes Methylcellulosemedium**

IMDM (Gibco BRL)

30 % Hyclone FCS

0,9 % Iscove's Methylcellulose (CellSystems, #HCC-4100)

$10^{-4}$  M  $\beta$ -Mercaptoethanol

100 ng/ml G-CSF

100 ng/ml GM-CSF

1 U/ml Epo

---

Methocult GF (CellSystems, #HCC-4434)

IMDM

0,9 % Iscove's Methylcellulose

30 % FCS

1 % BSA

3 U/ml Epo

$10^{-4}$  M  $\beta$ -Mercaptoethanol

2 mM L-Glutamin

50 ng/ml SCF

10 ng/ml GM-CSF

10 ng/ml IL-3

## 2.2.2.5 Transfektion

### 2.2.2.5.1 Transfektion von Zellen mit Elektroporation

Für die Transfektion der Jurkat-Zellen mittels Elektroporation wurde die Plasmid-DNA über Affinitätssäulen (Qiagen) isoliert und in sterilem Wasser resuspendiert.

$4 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen wurden zentrifugiert, das Pellet in 800  $\mu$ l Zellkulturmedium (mit Zusätzen) resuspendiert und mit 20  $\mu$ g Plasmid-DNA gemischt. Die Elektroporation erfolgte in sterilen Küvetten (Eurogentec, 0,4 cm Elektrodenabstand) bei 250 V und 750  $\mu$ F. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml Zellkulturmedium überführt und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 2.2.2.5.2 Transfektion adhärenter Zellen mit Calciumphosphat präzipitierter DNA

5 - 10  $\mu$ g DNA wurden in 66  $\mu$ l H<sub>2</sub>O mit 240  $\mu$ l 1,25 x HBS und 16,6  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> gemischt. Die Lösung wurde zweimal für 20 Sek. gevortext und für 20 Min. bei RT inkubiert.

Das Medium der Zellkultur wurde dann abgesaugt und das DNA-Präzipitat vorsichtig auf den Gefäßrand der Zellkulturschale gegeben. Nach weiteren 20 Min. Inkubation wurden

3 ml Medium zur Zellkultur gegeben und diese 4 - 6 Std. im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Medium gewechselt.

### **2.2.2.6 Arbeiten mit Retroviren**

#### *2.2.2.6.1 Kultivierung von Verpackungszellen*

Die ecotrope Zelllinie GP+E86 und die amphotrope Verpackungslinie GP+envAm12 wurden nach dem Auftauen für 24 Std. in DMEM-VP unter Standardbedingungen kultiviert. Danach wurden die Zellen in selektivem HXM-Medium gehalten. Langzeitkulturen waren auch mit halber Konzentration von Hypoxanthin, Xanthin und Mycophenolsäure möglich. Bei der Kultur dieser Zellen, insbesondere den GP+envAm12, war darauf zu achten, daß die Zellen nicht zu gering konzentriert ausgesät wurden. Genauso wenig durften die Zellen konfluent werden, so daß sie in der Regel dreimal wöchentlich geteilt wurden. Nach Transfektion oder retroviraler Transduktion wurden die Zellen mit DMEM-VP und einem Antibiotikum (z. B. G418) inkubiert.

Die amphotrope Verpackungslinie PA317 und die pseudotypisierte Verpackungslinie PG13 wurden in HAT-Medium als selektives Medium gehalten. Bei diesen Zellen war darauf zu achten, daß sie nicht zu stark überwuchsen. Ansonsten galten die gleichen Bedingungen wie oben.

#### *2.2.2.6.2 Generierung von Produzentenzellen*

Die Arbeiten mit Verpackungszellen, die noch nicht mit einem Vektor transfiziert oder transduziert waren, wurden unter Sicherheitsstufe 1 (S1) durchgeführt. Ecotrope GP+E86-Zellen wurden auch nach Transfektion mit einem retroviralen Vektor unter S1 weiterkultiviert. Amphotrope PA317 und GP+envAm12 und pseudotypisierte PG13 wurden nach Transduktion in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 (S2) weiterkultiviert. Genauso wurde mit allen Zellen verfahren, die mit amphotropen oder pseudotypisierten rekombinanten Viren infiziert wurden; es sei denn, es wurde sichergestellt, daß keine Helferviren vorhanden waren. In diesem Fall konnten die weiteren Arbeiten unter S1 durchgeführt werden.

Die ecotropen Verpackungszellen GP+E86 wurden mit 20 µg Vektorplasmid-DNA mittels Elektroporation oder der Calciumphosphatpräzipitation transfiziert. Nach 24 Std. wurden die Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert. Nachdem die Kultur frei von toten Zellen war, wurden die Viren geerntet.

Die amphotropen Verpackungslinien PA317 und GP+envAm12 sowie die pseudotypisierte Verpackungslinie PG13 wurden mit den retroviralen Überständen der virusproduzierenden GP+E86 Zellen in einer Verdünnungsreihe in 80 mm Zellkulturschalen (Falcon, #3003) infiziert. Die Selektion der Zellen mit Antibiotikum erfolgte nach 24 Std. Nach ca. zwei Wochen wurden antibiotikumresistente Klone isoliert. Hierzu wurde das Medium aus den Zellkulturschalen abgesaugt und mit einem PapPen (SCI) um vereinzelte Kolonien ein Kreis gezogen, so daß die Kolonien von einem hydrophoben Wachskreis umgeben waren. Auf jede dieser Kolonien wurde ein Tropfen Trypsin/EDTA gegeben. Nach einigen Minuten Inkubation wurden die Zellen mit einer Pipette abgespült und in 2 ml Medium mit Antibiotikum aufgenommen. Die Kolonien wurden erst in 24-well dann in 6-well und später auf 80 mm Zellkulturschalen weiterkultiviert. Der Titer des virushaltigen Überstandes wurde dann in einem Virus-Titer-Assay bestimmt und die Klone mit den höchsten Titern für spätere Infektionen weiterkultiviert. Die Bezeichnung der Produzentenlinien ergab sich aus dem Namen der Verpackungszelllinie, dem Namen des Vektors sowie ggf. einer Nummer, falls mehrere Klone mit gleichen Titern erhalten wurden. So war zum Beispiel der Name der Produzentenlinie, die LXSN-Vektoren verpackte und auf der Verpackungszelle PG13 basierte, PG13LXSN.

#### *2.2.2.6.3 Herstellung von Virusüberstand*

Die retrovirale Produzentenlinie wurde in einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche bis zur Konfluenz wachsen gelassen. 24 Std. vor Virusernte wurde das Medium gegen nicht-selektives Medium ausgetauscht und die Zellen bei 32 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Überstand wurde dann mit einer Pipette abgenommen und mit einem 0,45 µm-Filter (Millex HV, Millipore) zellfrei filtriert.

#### 2.2.2.6.4 Retrovirale Infektion

Zur Infektion von Zellen mit rekombinanten retroviralen Partikeln reicht es im allgemeinen aus, die Zielzellen zusammen mit den Viren zu kultivieren. Eine Steigerung der Transduktionseffizienz konnte erreicht werden, indem der Suspension 7,5 µg/ml des Polykations Polybren (Sigma, #H 9268) zugesetzt wurden. Da aber Polybrene leicht zelltoxisch ist, wurde statt dessen 5 µg/ml Protaminsulfat (Sigma, #P 4020), ebenfalls ein Polykation, dazugegeben.

#### 2.2.2.6.5 Retrovirale Infektion CD34<sup>+</sup>-Zellen mit Retronectin

Das lyophilisierte Retronectin (Takara, #T100B) wurde in H<sub>2</sub>O mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml gelöst und anschließend mit einem 0,2 µm-Filter sterilfiltriert. Diese Lösung wurde dann bei -20 °C aufbewahrt. Mit PBS wurde die Lösung dann auf eine Arbeitskonzentration von 9,6 - 96 µg/ml eingestellt. 420 µl dieser Lösung wurden auf eine nicht zellkulturbehandelte 24-Loch-Platte gegeben (Greiner, #) und diese bei Raumtemperatur auf der Sterilbank inkubiert. Nach 2 Std. wurde die Lösung abgesaugt und 420 µl PBS/2 % (w/v) BSA in jede Vertiefung gegeben. Nach weiteren 30 Min. Inkubation in der Sterilbank wurde die Lösung wieder abgesaugt und die Platte mit HBSS/2,5 % (v/v) 1M HEPES (Applichem, #A1069) gewaschen. Anschließend wurden 420 µl Virus-Zell-Gemisch mit Wachstumsfaktoren auf die beschichteten Platten gegeben. Im Abstand von 2 Std. wurden erneut 420 µl Virus auf die Zellen gegeben.

#### 2.2.2.6.6 Virus-Titer-Assay

Einen Tag vor dem Versuch wurden Hela-Zellen zum Austesten des Überstandes von amphotropen und pseudotypisierten Verpackungszellen und NIH/3T3 Zellen zum Austesten des Überstandes von ecotropen Verpackungszellen auf einer 24-Loch-Platte ausgesät (1 - 5 x 10<sup>4</sup> Zellen/well in 1 ml Medium). Der Virusüberstand wurde durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und eine Verdünnungsreihe in 10er-Schritten angesetzt. Jeweils 1 ml dieser Verdünnungsreihe wurde auf die Zellen gegeben. Zur Steigerung der Infektiosität wurden 10 µg/ml Protaminsulfat (Endkonzentration 5 µg/ml) zu den Ansätzen gegeben. Nach 24 Std. wurde das Medium gegen DMEM mit Antibiotikum ausgetauscht.

Nach etwa 14tägiger Inkubation wurden die Kolonien gezählt und der Virustiter entsprechend ausgerechnet.

#### *2.2.2.6.7 Nachweis von replikationskompetenten Retroviren*

Der Überstand von konfluenten Produzentenzellen wurde durch einen 0,45 µm-Filter zellfrei filtriert. Es war darauf zu achten, daß das Medium vorher für mindestens 24 Std. auf den Zellen war. Der gefilterte Überstand wurde auf NIH/3T3- oder Hela-Zellen gegeben und nach Zugabe von 5 µg/ml Protaminsulfat für mindestens 24 Std. inkubiert. Danach wurde das Medium gegen DMEM-VP ausgetauscht. Die Zellen wurde für mindestens zehn Tage weiterkultiviert. Während dieser Zeit sollten die Zellen möglichst konfluent und das Volumen des Nährmediums möglichst klein sein. Anschließend wurde der Überstand erneut abgenommen, zellfrei filtriert, 5 µg/ml Protaminsulfat dazugegeben und wiederum auf Hela oder NIH/3T3 gegeben und für etwa 24 Std. inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und DMEM-VP mit 600 µg/ml G418 auf die Zellen gegeben und etwa zwei Wochen inkubiert. Wären nach 14 Tagen Kolonien zu sehen gewesen, wäre dies ein Hinweis, daß sich replikationskompetente Retroviren gebildet hätten.

### **2.2.2.7 Methoden zur Untersuchung von Apoptose**

#### *2.2.2.7.1 Induktion der Apoptose durch Serumentzug*

Einen Tag vor Beginn des Experimentes wurde das Medium der zu untersuchenden Zellen gewechselt. Für das eigentliche Experiment wurde die Zellsuspension geteilt, abzentrifugiert und eine Hälfte in normalem RPMI-Medium mit Serum, L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin resuspendiert; die andere Hälfte wurde in RPMI-Medium ohne Serum mit L-Glutamin und Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Die Zellen wurden dann mehrere Tage inkubiert, und täglich wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Der Verlauf der Lebendzellzahlbestimmung diente als Maß für die Bestimmung der Apoptose.

#### 2.2.2.7.2 *Camptothecin induzierte Apoptose*

24 Std. vor Induktion der Apoptose wurde das alte Zellkulturmedium durch frisches Medium (ohne Selektionsantibiotika) ersetzt. Für die Induktion der Apoptose wurden die Zellen auf eine Dichte von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml und einem Volumen von 1 ml eingestellt. Camptothecin (Sigma, #C9911) wurde dann in einer Endkonzentration von 200 ng/ml dazugegeben und die Zellen für 2 - 6 Std. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrolle wurde ein identischer Ansatz, allerdings ohne Camptothecin, inkubiert.

#### 2.2.2.7.3 *Durchflußzytometrische Quantifizierung apoptotischer Zellen durch Färbung mit Annexin-V*

Nach der Induktion wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 x Binding-Buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4; 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) mit einem Titer von  $1 \times 10^6$  aufgenommen. Jeweils 100 µl dieser Lösung wurden dann in vier 4 ml-Reaktionsgefäße überführt. Zu dem ersten Röhrchen wurde nichts zugesetzt, zu dem zweiten 5 µl Annexin V-PE (Pharmingen), zu dem dritten 5 µl 7-AAD und zu dem vierten 5 µl Annexin V-PE und 5 µl 7-AAD.

Die Suspension wurde leicht gevortext und 15 Min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 400 µl 1 X Binding-Buffer dazugegeben. Die Messung wurde dann innerhalb einer Stunde im FACS durchgeführt.

Die Zellen, die sich mit Annexin V-PE färben ließen, waren apoptotisch oder nekrotisch. Eine Unterscheidung wurde durch die Doppelfärbung mit 7-AAD möglich, das ausschließlich tote Zellen färbte.

### 2.2.3 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Alle Methoden, die hier nicht im einzelnen aufgeführt sind, wurden entsprechend den gängigen Protokollen durchgeführt, die in Sambrook et al. 1989 oder Ausubel et al. 1991 beschrieben sind.

### 2.2.3.1 Nukleinsäure-Präparationen

#### 2.2.3.1.1 Plasmid-Minipräparation mit 'QIAprep Spin Plasmid Kit' (Qiagen, # 27106)

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden 5 Min. bei max. Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 250 µl Resuspendierungspuffer *P1* (4 °C) resuspendiert, so daß das Pellet völlig aufgelöst und keine Klumpen mehr vorhanden waren. Zu dieser Suspension wurden 250 µl Lysepuffer (*P2*) dazugegeben und die Suspension durch vorsichtiges mehrmaliges Wenden gemischt und stengelassen, bis die Lösung klar wurde (nicht länger als 5 Min.). Es wurden dann 350 µl Neutralisierungspuffer (*N3*) zu der Lösung gegeben, sofort vorsichtig gemischt und 20 Min. bei max. Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge das Präzipitat abzentrifugiert. Ein *Qiaprep Spin Column*-Röhrchen wurde in ein 2 ml-Sammelgefäß gesetzt und mit dem Überstand der Zentrifugation gefüllt. Nach 1 Min. Zentrifugation bei 13.000 Upm. wurde das Sammelgefäß geleert und die Säule mit 500 µl Waschpuffer *PB* gefüllt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sammelgefäß wieder geleert und die Säule mit 500 µl Puffer *PE* gefüllt. Die Säule wurde wieder zentrifugiert und nach Entleerung des Sammelgefäßes noch einmal zentrifugiert, damit die Säule völlig trocken war. Die Säule wurde dann in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt. Anschließend wurden 50 µl Puffer *TE* oder *EB* vorsichtig auf den Filter gegeben und nach 5 Min. bei 10.000 Upm. für 1 Min. in der Tischzentrifuge abzentrifugiert.

#### 2.2.3.1.2 Schnelle Plasmid-Minipräparation

Aus einer Übernachtskultur wurden 0,5 ml Bakteriensuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 0,5 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) 1 Min. stark gevortext. Anschließend wurde die Lösung 5 Min. in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, so daß sich die Phasen trennen konnten. Während der Zentrifugation wurde in einem neuen 1,5 ml-Reaktionsgefäß 0,5 ml Isopropanol vorgelegt. Aus der oberen wäßrigen Phase wurden 0,45 ml auf das Isopropanol gegeben und die Plasmid-DNA durch unmittelbares Zentrifugieren für 5 Min. pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 0,5 ml Ethanol (70 %) gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und in *TE* mit *RNase* resuspendiert. Bei dieser Methode tritt häufig eine leichte



Verunreinigung durch genomische DNA auf, so daß sie mehr zur Analyse einer großer Anzahl Proben geeignet ist als zur Präparation für Sequenzierung oder PCR.

#### *2.2.3.1.3 Plasmid-Maxi Präparation mit dem CsCl<sub>2</sub>-Dichtegradienten*

500 ml LB-Medium mit Antibiotikum wurden mit 500 µl einer Vorkultur angeimpft und für 16 - 20 Std. im Inkubationsschüttler bei 300 Upm. inkubiert. Die Kultur wurde bei 4 °C und 5.000 g für 15 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 6 ml Lysepuffer und einer Spatel-spitze Lysozym durch mehrmaliges Auf- und Niederpipettieren resuspendiert und 10 Min. auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 12 ml frisch angesetztem Aufschlußpuffer (0,2 N NaOH, 1 % (w/v) SDS) wurden die Zellen dann lysiert. Hierbei war darauf zu achten, daß die Suspension vorsichtig durchmischt und nicht gevortext wurde. Nach einer 10minütigen Inkubation auf Eis wurde die nun lysierte Suspension mit 9 ml Neutralisationspuffer (3 M KAc pH 4,6) neutralisiert, vorsichtig gemischt und für weitere 20 Min. auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde dann mit 12.000 Upm. im JA14-Rotor bei 4 °C und 40 Min. Dauer abzentrifugiert und der Überstand in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurden 27 ml Isopropanol gegeben und die Lösung 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde durch eine 30minütige Zentrifugation bei 2.000 Upm. pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit kaltem 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 30 Min. bei 2.000 Upm. zentrifugiert. Das Ethanol wurde vollständig abgesaugt und das Pellet an der Luft getrocknet.

Dann wurde das Pellet in 8 ml TE resuspendiert und darin 8 g CsCl<sub>2</sub> gelöst. Schließlich wurden 0,4 ml EtBr-Lösung dazugegeben. Die Lösung wurde anschließend mit einer Spritze mit langer Kanüle (0,9x40, B.Braun) in verschweißbare Zentrifugenröhrchen (Beckmann) überführt, gewogen und mit TE austariert. Mit Mineralöl wurde das Röhrchen dann vollständig gefüllt und zugeschweißt. Danach wurden die Röhrchen für 20 Std. bei 20 °C und 55.000 Upm. in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Das Röhrchen wurde dann vorsichtig aus dem Rotor genommen. Durch Durchstechen mit einer Spritze mit Kanüle von unten wurde die untere Bande abgesaugt und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Es wurden dann 6 ml TE zugesetzt und mit n-Butanol auf 1M NaCl auf 12 ml aufgefüllt und geschüttelt. Die obere Butanolphase wurde abgenommen und nochmals mit n-Butanol auf 12 ml aufgefüllt, geschüttelt, erneut verworfen und ein

drittes Mal mit n-Butanol überschichtet und geschüttelt. Die obere Butanolphase wurde dann vollständig abgenommen, die Lösung mit TE auf 10 ml aufgefüllt in ein 50 ml Röhrchen überführt und 30 ml Ethanol (abs.) zugesetzt.

Zur Fällung der DNA wurde das Röhrchen über Nacht bei -20 °C stehengelassen und am nächsten Tag 20 Min. bei 3.000 Upm. zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend zweimal mit Ethanol (70 %) gewaschen und trocknen gelassen. Schließlich wurde die DNA in 500 µl TE resuspendiert.

#### *2.2.3.1.4 Plasmid-Maxi (-Midi) Präparationen mit dem 'QIAGEN Plasmid Maxi (Midi) Kit' (Qiagen, #12163, 12143)*

In Abhängigkeit vom verwendeten Bakterienstamm und dem zu isolierenden Plasmid war das Ausgangsvolumen und die Zusammensetzung des verwendeten Mediums sehr unterschiedlich, die Behandlung war jedoch nach Pelletierung der Bakterien gleich.

Durch Zugabe von 10 ml (5 ml) Resuspendierungspuffer *P1* wurde das Bakterienpellet so lange geschüttelt, bis sich keine Klumpen mehr in der Suspension befanden. Nach Zugabe von 10 ml (5 ml) Lysepuffer *P2* kam es zu einem Aufklaren der Lösung, die etwa 15 Min. bei RT stehen blieb. Anschließend wurde die Lösung mit 10 ml (5 ml) kaltem Puffer *P3* neutralisiert und nach sofortigem Mischen 30 Min. auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde in einem 250 ml Zentrifugenbecher bei 11.500 Upm. im JA-14-Rotor bei 4 °C 30 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 30 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt und für weitere 30 Min. bei 14.000 Upm. im JA-17-Rotor bei 4 °C zentrifugiert.

Während der Zentrifugation wurde eine QIAGEN-500 (-100)-Säule mit 10 ml (4 ml) Puffer *QB* equilibriert. Nachdem die Säule leergelaufen war, wurde der klare Überstand der Zentrifugation auf die Säule gegeben (gegebenenfalls wurde er vorher noch filtriert). Anschließend wurde die Säule zweimal mit 30 ml (10 ml) Puffer *QC* gewaschen und die DNA dann mit 15 ml (5 ml) Puffer *QF* eluiert. Durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol (abs.) wurde die DNA präzipitiert und bei 3.300 Upm. und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit Ethanol (70 %) gewaschen und das DNA Pellet an der Luft leicht getrocknet. Die DNA wurde dann in 50 - 200 µl TE gelöst.

#### 2.2.3.1.5 Präparation genomischer DNA mit QIAamp Tissue Kit (Qiagen, #29304)

Von den zu präparierenden Zellen wurden  $10^7$  in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß abzentrifugiert und in 200 µl Puffer PBS resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 25 µl der zum Kit gehörenden Proteinase K-Lösung sowie 200 µl Puffer AL dazugegeben. Die Suspension wurde sofort gevortext und anschließend für 10 Min. bei 70 °C inkubiert. Nach Zugabe von 210 µl Ethanol (abs.) wurde die Lösung gevortext und auf eine *QIAamp Spin-Säule* gegeben, die in einem 2 ml-Sammelröhrchen steckte. Dieses wurde anschließend 1 Min. bei 8.000 Upm. in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die *QIAamp Spin-Säule* wurde dann in ein neues sauberes Sammelröhrchen gesteckt. Nach Zugabe von 500 µl Puffer AW erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 8.000 Upm. Die Säule wurde in ein neues Sammelröhrchen gesteckt, und nach Zugabe von 500 µl Puffer AW erfolgte eine Zentrifugation bei 8.000 Upm für 1 Min. Anschließend wurde eine zweiminütige Zentrifugation bei max. Geschwindigkeit durchgeführt. Die Säule wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß gesetzt, und die DNA wurde zweimal mit auf 70 °C vorgeheiztem Puffer AE eluiert (durch 1 Min. Inkubation und 1 Min. Zentrifugation bei 8.000 Upm.).

#### 2.2.3.1.6 Isolierung von Gesamt-RNA mit RNazol B (Biozol)

$2 \times 10^7$  Zellen wurden in 10 ml PBS für 5 Min. bei 1.500 Upm. zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer ausgezogenen Pasteurpipette restlos entfernt, so daß das Pellet weitestgehend trocken war. Auf Eis wurde das Pellet danach mit 1,5 ml RNazol B lysiert und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Lysat durch eine 2 ml-Spritze mit langer Nadel (0,9x24, B. Braun) geschert, um die genomische DNA zu fragmentieren. Nach Addition von 1/10 Vol. Chloroform wurde die Lösung 20 Sek. gevortext, blieb 5 Min. auf Eis stehen und wurde dann für 15 Min. bei 13.000 Upm. zentrifugiert. Die obere wäßrige (nicht blaue) Phase wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit einem gleichen Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) gemischt und erneut 15 Min. bei 13.000 Upm. zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde wieder in ein neues 2 ml-Gefäß überführt und zur Fällung der DNA mit einem Vol. Isopropanol bei -20 °C stengelassen. Die präzipitierte RNA wurde durch eine Zentrifugation für 20 Min. bei max. Geschwindigkeit pelletiert und mit Ethanol (80 %) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde die Flüssigkeit restlos abgesaugt

und das RNA-Pellet an der Luft leicht trocknen gelassen. Die RNA wurde anschließend in DEPC-Wasser gelöst.

### 2.2.3.2 DNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in Horizontalgelelektrophoresekammern (Bio-Rad). In der Regel wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Hierzu wurde 0,5 g Agarose (Serva) in 50 ml 1 x TAE in der Mikrowelle aufgekocht, und kurz vor dem Gießen des Gels wurden 2,5 µl Ethidiumbromidlösung dazugegeben (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Zu der aufzutrennenden DNA wurde 1/5 Volumen 6 x SB dazugegeben. Das Gel wurde in die mit 1 x TAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, beladen und bei ca. 100 V so lange laufengelassen, bis die Bromphenolblau-Front etwa 2/3 der Gellänge erreicht hat. Das Gel wurde mit dem GelDoc 1000 (Bio-Rad) abgelichtet und mit der Molecular Analyst Software (Bio-Rad) ausgewertet.

### 2.2.3.3 DNA Extraktion aus Agarosegelen mit *QIAquick* (Qiagen, #28706)

Die zu isolierende Bande wurde möglichst klein aus einem Agarosegel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Zu dem Agarosestück wurden drei Volumen (1 µl = 1 mg) QX1-Lösung dazugegeben. Hierbei war darauf zu achten, daß die Lösung ihre Farbe nicht veränderte. Bei 50 °C wurde das Agarosestück 10 Min. aufgelöst, ein Volumen Isopropanol entsprechend der Gelstückgröße dazugegeben und das Ganze in ein *Qiaquick Spin Column* Röhrchen gegeben und 1 Min. bei 13.000 Upm. auf der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die durchgelaufene Fraktion wurde verworfen, und auf die Säule wurden 500 µl QX1-Lösung gegeben und erneut zentrifugiert. Die durchgelaufene Fraktion wurde erneut verworfen, und jetzt wurden 750 µl Puffer *PE* auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde wieder weggeschüttet und die Säule noch einmal zentrifugiert, damit sie vollständig trocken war. Zur Elution der DNA wurden 30 - 100 µl H<sub>2</sub>O, TE oder Puffer *EB* auf die Säule gegeben und für etwa 5 Min. stehengelassen. Die Säule wurde dann in ein neues sauberes 1,5 ml-

Reaktionsgefäß gegeben und für 1 Min. zentrifugiert. Die Ausbeute mit diesem Verfahren lag bei etwa 50 - 70 %.

### **2.2.3.4 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren**

#### *2.2.3.4.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA*

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA wurde in der Regel nur von genomischer DNA, Plasmid Midi- und Maxi-Präparationen und Gesamt RNA Isolation gemacht. Hierzu wurde ein Aliquot der Lösung verdünnt und die Absorption bei 260 nm photometrisch in einer Quarzküvette bestimmt. Die Verdünnung wurde so gewählt, daß die Absorption bei 0,1 - 1 OD-Einheiten lag. Die Konzentration ließ sich dann wie folgt berechnen:

$$\text{DNA-Konz.}[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{Extinktion}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \times 1.000$$

$$\text{RNA-Konz.}[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{Extinktion}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \times 1.000$$

#### *2.2.3.4.2 Konzentrationsbestimmung von DNA in Agarosegelen*

Kleine DNA-Mengen, wie die aus Plasmid Minipräparationen oder aus Gelextraktionen, wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. Als Massenreferenz wurden in mehreren Spuren unterschiedliche Volumina Lambda-DNA/HindIII aufgetragen. Durch Vergleich der Intensität der Ethidiumbromid-gefärbten Banden konnte eine recht genaue Einschätzung der DNA-Menge vorgenommen werden.

### **2.2.3.5 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren**

#### *2.2.3.5.1 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen*

Die endonukleolytische Spaltung von Plasmid-DNA wurde entsprechend den Standardvorschriften (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen der verschiedenen Restriktionsenzyme wurden nach den Empfehlungen der Hersteller gewählt. Für analytische Zwecke wurden in der Regel 0,5 bis 1 µg Plasmid-DNA mit 10 U Enzym

bei 37 °C für 2 Std. inkubiert. Präparative Spaltungen mit bis zu 20 µg Plasmid-DNA erfolgten mit 20 bis 30 U Enzym bei 37 °C über Nacht. Durch elektrophoretische Auftrennung einer geringen Menge des Ansatzes in Agarosegelen wurde die Spaltung auf Vollständigkeit überprüft. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden anschließend mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)- und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)-Extraktion vom Restriktionsenzym gereinigt. Nach Zugabe von  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol (abs.) wurden die DNA-Fragmente 10 Min. bei -20 °C präzipitiert. Die Präzipitate wurden 15 Min. bei 4 °C und 13.000 Upm. pelletiert und die verbliebenen Salze durch Waschen mit 70 %igem Ethanol entfernt. Nach Trocknung wurde das Pellet in einem geeigneten Volumen TE oder H<sub>2</sub>O gelöst.

#### *2.2.3.5.2 Partiemler Verdau von Plasmid DNA*

Für den partiellen Verdau wurde die DNA in einem 100 µl Volumen zusammen mit einfach konzentriertem Restriktionspuffer angesetzt. Diese Lösung wurde auf fünf 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt (1.: 30 µl, 2. - 4.: 20 µl, 5.: 10 µl) und auf Eis gestellt. In das erste Gefäß wurden 3 - 5 U Restriktionsenzym/µg Plasmid-DNA gegeben. Nach sorgfältigem Mischen wurden 10 µl in das zweite Gefäß gegeben usw., so daß am Ende alle Gefäße ein Volumen von 20 µl hatten. Nach Inkubation bei 37 °C für 10 Min. wurden die Gefäße auf Eis gestellt und damit die Reaktion gestoppt.

#### *2.2.3.5.3 Auffüllen von 5' überhängenden Enden mit dem Klenow-Enzym*

Das Auffüllen überhängender 5'-Enden erfolgte mit Hilfe des Klenow-Enzyms (großes Fragment der DNA-Polymerase I von E. coli, Boehringer Mannheim, #1008 404) direkt nach der Restriktion im Restriktionsenzym-puffer. Nach Zugabe von 1 µl 10 mM dNTPs und 0,1 U Enzym wurde der Ansatz 15 Min. bei 30 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch 10minütiges Erhitzen bei 75 °C inaktiviert.

#### *2.2.3.5.4 Entfernen von 3'-Überhängen mit der T4-DNA-Polymerase*

Das Abschneiden überhängender 3'-Enden wurde mit der T4-Polymerase (Promega, #M4211) nach DNA-Spaltung im Restriktionspuffer durchgeführt. Zum Ansatz wurden 1 µl 10 mM dNTPs (Pharmacia, #27-2035) und 0,1 U Enzym gegeben, 15 Min. bei 12 °C inkubiert und die Polymerase danach 10 Min. bei 75 °C inaktiviert.

#### *2.2.3.5.5 Dephosphorylierung*

Vor der Ligation von Vektor- und Fragment-DNA wurden die 5'-Phosphatreste des Vektors entfernt, wenn dieser nur mit einem Restriktionsenzym geöffnet wurde oder die Enden aufgefüllt bzw. abgeschnitten waren, um eine Selbstligation zu verhindern. Die Dephosphorylierung erfolgte mit 1 U Alkalischer Phosphatase (CIP oder SAP, Boehringer Mannheim, #713023 bzw. #1758250) pro 50 bis 100 pmol 5'-Phosphatenden in einem Reaktionsvolumen von 50 µl (50 mM Tris/Cl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) für 30 Min. bei 37 °C und dann nach erneuter Zugabe von 1 U CIP für 30 Min. bei 56 °C. Das Enzym wurde durch Phenol-, Phenol/Chloroform (24/1)- und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)-Extraktion entfernt und die DNA mit 1/10 Volumen 3M NaAc und dreifachem Volumen Ethanol (abs.) präzipitiert.

#### *2.2.3.5.6 Reverse Transkription*

3 µg Gesamt-RNA wurden in 19 µl DEPC-H<sub>2</sub>O 5 Min. auf 75 °C erwärmt, um die Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde folgender Reaktionsmix angesetzt:

- 19 µl RNA-Lösung
- 0,6 µl RNase-Inhibitor (30 U/µl, Boehringer Mannheim)
- 1 µl Primer (30 pmol/µl)
- 1,5 µl dNTPs (je 10 mM, Pharmacia #27-2035)
- 3 µl 10 X MMLV-RT Puffer
- 2 µl MMLV Reverse Transkriptase (Gibco BRL, #28025-013, 25 U/µl)

Die Reaktion wurde 60 Min. bei 37 °C inkubiert und durch Erwärmung auf 75 °C für 10 Min. abgestoppt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

#### *2.2.3.5.7 Polymerasekettenreaktion*

Zur spezifischen Amplifikation definierter DNA-Bereiche wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Als Ausgangsmaterial dienten cDNA oder genomische DNA. Negativkontrollen enthielten den Reaktionsansatz ohne DNA. Als Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA, die den entsprechenden DNA-Bereich enthielt, eingesetzt. Der Standardreaktionsansatz wurde in einem 500 µl Reaktionsgefäß wie folgt zusammenpipettiert:

- 5 µl PCR Reaction Buffer (Boehringer Mannheim)
- 5 µl dNTP-Lösung (je 2mM, Pharmacia, #27-2035)
- 1 µl Vorwärtsprimer (20 pmol/µl)
- 1 µl Rückwärtsprimer (20 pmol/µl)
- 3 µl cDNA oder 1 µg genomische DNA
- 1 µl Taq- Polymerase (2,5 U/µl High-Fidelity, Boehringer Mannheim, #1732 650)

in einem Gesamtvolumen von 50 µl, das mit 50 µl Mineralöl überschichtet wurde.

Die Reaktion wurde dann im Thermocycler inkubiert, der so programmiert wurde, daß nach einer initialen Denaturierung für 2 Min. bei 90 °C, 32 Reaktionscyclen (60 Sek. bei 90 °C, 50 Sek. bei 55 °C, 70 Sek. bei 72 °C) durchlaufen wurden. Die Reaktion endete mit einem terminalen Polymerisationsschritt von 5 Min. bei 72 °C. Die Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

#### *2.2.3.5.8 Ligation*

Die Ligation doppelsträngiger DNA-Moleküle erfolgte mit der T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim, #481220) in Ligationspuffer (66 mM Tris-HCl pH7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM



EDTA; 0,5 mM DTT; 0,2 mM ATP) in einem Ansatzvolumen von 15 µl. Das molare Verhältnis von *Insert*-DNA zu Vektor-DNA betrug etwa 3:1 bis 5:1. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 14 °C inkubiert. 5 bis 10 µl der Ansätze wurden zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet.

Für Klonierungen von PCR-Produkten wurde der pGEM-T Vektor (Promega) verwendet. Dieser Vektor ist linearisiert und hat an beiden 3'-Enden einzelne T-Überhänge. Dieser Vektor wurde entsprechend den Herstellerangaben in einem Kit verwendet. Ob ein Insert in das Plasmid ligiert wurde, konnte nach Transformation von JM109 oder XL1-Blue Bakterien durch Färbung der Bakterienkolonien auf LB/Amp/X-Gal/IPTG Platten kontrolliert werden. Weiße Kolonien trugen mit großer Wahrscheinlichkeit ein Insert, während blaue Kolonien das Resultat von Vektorselbstligationen waren.

Für einige Klonierungen wurde der *Rapid DNA Ligation Kit* (Boehringer Mannheim, #1635379) gemäß den Anweisungen des Herstellers benutzt. Dieses Kit erlaubt die Durchführung einer Ligation innerhalb weniger Minuten.

#### 2.2.3.5.9 Sequenzierung mit Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB)

##### Sequenzierreaktion

10 µg der zu sequenzierenden Plasmid-DNA in einem Volumen von 18 µl wurden mit 2 µl 2 N NaOH für 10 Min. bei RT denaturiert, mit 10 µl 3 M NaAc-Lösung neutralisiert und mit 2 Vol. Ethanol (abs.) mindestens 20 Min. bei -20 °C gefällt. Die präzipitierte denaturierte DNA wurde durch Zentrifugation für 20 Min. bei 4 °C und 13.000 Upm. pelletiert, das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet an der Luft trocknen gelassen. Die pelletierte DNA wurde mit 6 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl *Reaction Buffer* und 2 µl 0,5 pM Primer resuspendiert, einen Puls abzentrifugiert, 2 Min. im Heizblock bei 65 °C erwärmt und dann wurde der Heizblock auf 37 °C gestellt und die Lösung langsam abkühlen lassen (mindestens 20 Min.), damit der Primer an die komplementäre Stelle der DNA binden konnten. Anschließend wurde die Lösung kurz abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt.

Während des Abkühlens wurden für jede Probe vier 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit 2,5 µl *Termination-Mix* vorbereitet und beschriftet (A, C, G und T). Des weiteren wurde der *Labeling-Mix* 1:5 mit H<sub>2</sub>O vorverdünnt und die vier Terminationsröhrchen im 37 °C Heizblock vorgewärmt.

Die eigentliche Markierungsreaktion wurde wie folgt angesetzt:

10 µl kalte DNA-Lösung  
1 µl 0,1 M DTT  
2 µl verdünntes *Labeling-Mix*  
0,5 µl [<sup>35</sup>S]dCTPαS 37 MBq, 1 mCi (Amersham)  
2 µl verdünnte (1:8) Sequenase Polymerase

Die Lösung wurde gemischt und 2 - 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je 3,5 µl der Markierungsreaktion in jedes der vorbereiteten vier Terminationsröhrchen (A, C, G und T) gegeben und für 5 Min. bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 4 µl *Stop-Solution* wurde die Reaktion angehalten.

### Sequenzgelelektrophorese

Die Glasplatten wurden gründlich gereinigt und die kleinere Platte leicht mit Silikon beschichtet. Für das Gel wurde 31 g Harnstoff (Applichem, #A1361) abgewogen und in 35 ml H<sub>2</sub>O und 7,5 ml 10 X TBE unter fließend warmem Wasser gelöst. Anschließend wurden 11 ml Rotiphorese-Gel40 (Roth) dazugegeben, Partikel durch Filtration durch ein 0,45 µm Filter entfernt und die Lösung im Vakuum entgast. Die Glasplatten wurden mit 0,5 mm Spacern zusammengesetzt und waagrecht auf eine ebene Unterlage gelegt. Zu der Lösung wurden dann 450 µl APS und 72 µl TEMED (Sigma, #T 9281) dazugegeben, gut gemischt und das Gel sofort blasenfrei gegossen.

Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in die Vertikalelektrophoresekammer eingespannt. In die obere Pufferkammer wurde 0,5 X TBE und in die untere 0,5 L 1 X TBE gegeben. Vor dem Auftragen der Proben wurde eine Spannung von etwa 1.400 V bei 80 W Leistung angelegt, damit das Gel vorgewärmt war. Als das Gel eine

---

Temperatur von 50 °C erreicht hatte, wurden die Proben aufgetragen und eine Leistung von 40 W eingestellt. Das Gel lief so lange, bis die erste blaue Front in das Pufferreservoir gelaufen war. Dann wurden 100 ml 3 M NaAc in die untere Pufferkammer gegeben, und das Gel lief weiter bis die zweite blaue Front etwa 90 % der Gellänge gelaufen war.

Die Platten mit dem Gel wurden aus der Kammer entfernt und auf eine saugfähige Unterlage mit der kleineren Platte nach oben gelegt. Diese wurde dann entfernt und ein genau zugeschnittenes angefeuchtetes Stück Whatman 3MM-Papier auf das Gel blasenfrei gelegt. Auf das Papier wurden weitere trockene Papiertücher vorsichtig aufgepreßt, so daß überschüssige Feuchtigkeit abgesaugt wurde. Das Gel wurde dann mit dem Papier von der Glasplatte abgezogen und im Vakuum bei 80 °C 1 Std. getrocknet.

Das Papier mit dem trockenen Gel wurde dann zusammen mit einem Biomax-Film (Kodak) in eine Autoradiografiekassette gelegt, und je nach Intensität der Strahlung wurde der Film 2 - 5 Tage exponiert und anschließend entwickelt.

### 3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Protokoll zu entwickeln, das es ermöglicht, den *PIG-A* Gendefekt in undifferenzierten Knochenmarksvorläuferzellen von PNH-Patienten durch retroviralen Gentransfer zu komplementieren. Hierzu mußte zunächst ein Modell in Form einer T-Zelllinie mit einem *PIG-A* Gendefekt etabliert werden. Hiermit wurde der Gentransfer in Zellen von PNH-Patienten simuliert, um die Eignung verschiedener Vektorsysteme für die Komplementierung zu analysieren.

Für den Gentransfer wurden verschiedene retrovirale Vektoren kloniert, die sowohl durch Transfektion der Plasmid-DNA als auch durch Transduktion rekombinanter Viren in der Zelllinie hinsichtlich der Expression des *PIG-A* Gens überprüft wurden.

Ein retroviraler Gentransfer kann nur in Zellen erfolgen, die sich in einem gewissen Zeitraum nach der Infektion teilen, da die provirale DNA die Kernmembran nicht überwinden kann (Miller et al. 1990). Erst in der Zellteilung wird die Kernmembran abgebaut, und die provirale DNA kann in das Genom des Wirtes integrieren. Die undifferenzierten Stamm- oder Vorläuferzellen des Knochenmarks befinden sich allerdings überwiegend in  $G_0/G_1$  und müssen daher durch Zugabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zur Teilung angeregt werden. Ein weiterer Teil dieser Arbeit beinhaltet daher die Untersuchung des Einflusses von diesen Zytokinen und Wachstumsfaktoren in verschiedenen zusammengesetzten Kombinationen. Diese Erkenntnisse boten die Grundlage zur anschließenden Transduktion dieser Zellen mit retroviralen Vektoren.

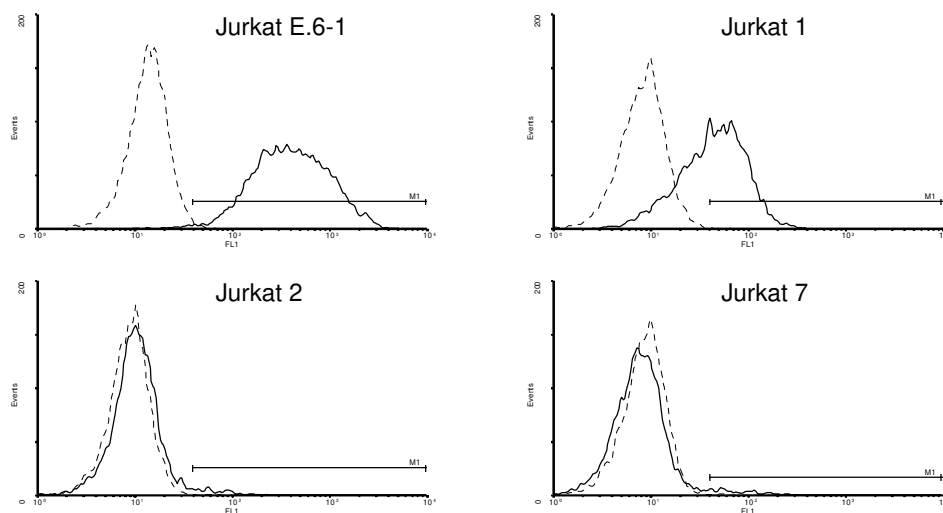
Schließlich wurden diese Protokolle auch auf die Stimulation und Transduktion von Knochenmarksvorläuferzellen von PNH-Patienten angewendet.

### 3.1 Charakterisierung von *in vitro* mutagenisierten Jurkat Zellen

#### 3.1.1 Sequenzierung des *PIG-A* Gens

Jurkat E.6-1 Zellen wurden von Marcel Deckert aus der Arbeitsgruppe von Alain Bernard in Nizza *in vitro* mutagenisiert. Zellen, die daraufhin das GPI-verankerte CD59 nicht exprimierten, wurden angereichert, und Einzelzellen wurden kloniert. Auf diese Weise wurden drei Klone (1, 2 und 7) identifiziert, die einen Defekt in der CD59-Oberflächenexpression zeigten.

Um herauszufinden, ob die fehlende Oberflächenexpression des CD59 auf die eigentliche Synthese von CD59 zurückzuführen war oder ob die Ursache in einer fehlerhaften GPI-Verankerung zu suchen war, wurden die Zellen bezüglich der Expression des ebenfalls GPI-verankerten CD48 untersucht. Die in Abbildung 6 dargestellte durchflußzytometrische Untersuchung zeigte, daß die Klone 2 und 7 das GPI-verankerte CD48 ebenfalls nicht exprimierten. Auf Klon 1 wurde nur eine reduzierte Expression gefunden.

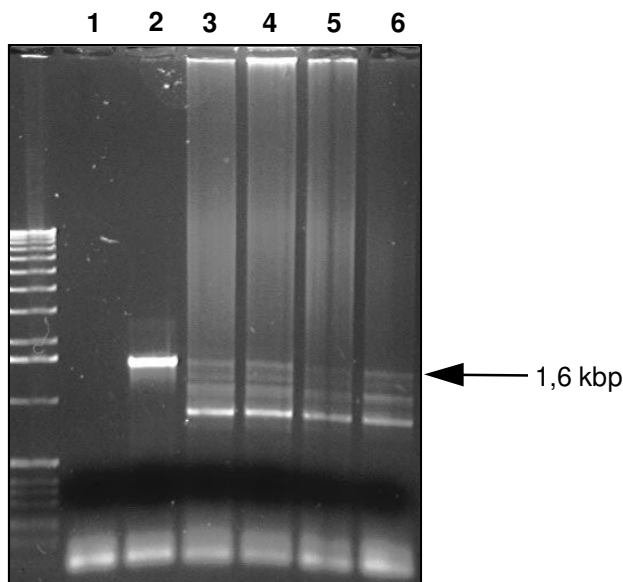


**Abbildung 6: Durchflußzytometrische Analyse verschiedener Jurkat-Klone**

Die Zellen wurden mit dem gegen CD48 gerichteten mAk MEM-102 markiert (geschlossene Linie). Als Sekundärantikörper wurde anschließend FITC konjugierter Ziege-anti Maus Antikörper dazugegeben. Als Negativkontrolle diente der mAk 5E5 (gestrichelte Linie), der mit dem gleichen Sekundärantikörper behandelt wurde. Während die Ausgangszelllinie Jurkat E.6-1 CD48 auf der Oberfläche exprimierte, war die Expression bei dem Klon 1 stark reduziert oder fehlte bei den Klonen 2 und 7 ganz.

Für die weitere Untersuchung war es nun wichtig zu wissen, an welchem Reaktionsschritt die GPI-Synthese in diesen Zellen unterbrochen ist. Aus diesem Grund wurden von diesen Zellen Lysate hergestellt, die auf ihre Fähigkeit, bestimmte Intermediate zu bilden, untersucht wurden. Diese Analyse ergab, daß bereits der erste Schritt der GPI-Biosynthese, also die Transferreaktion des GlcNAc auf das PI, betroffen war. Hier fand sich in Klon 1 eine reduzierte Aktivität, während die Klone 2 und 7 nicht zur Synthese von GlcNAc-PI fähig waren (Nischan 1998).

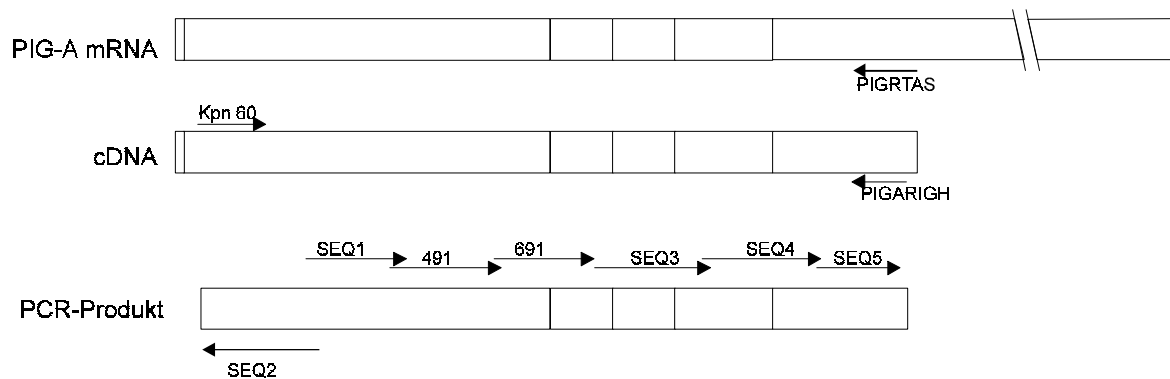
Die vier Proteine, die an diesem Reaktionsschritt beteiligt sind, wurden bereits identifiziert und die dazugehörigen Gene kloniert. Des weiteren ist die chromosomale Lokalisation jedes einzelnen dieser vier Gene bekannt. Lediglich das *PIG-A* Gen liegt auf dem X-Chromosom, während die anderen Gene ausschließlich auf Autosomen lokalisiert sind. D. h., daß eine einzige Mutation ausreichen kann, um das *PIG-A* Gen zu inaktivieren, da es nur eine aktive Kopie gibt, während bei Genen auf Autosomen beide mutiert sein müssen. Aus diesem Grund war es sehr wahrscheinlich, daß in diesen Klonen das *PIG-A* Gen mutiert und somit das Genprodukt inaktiv war. Um diese Vermutung zu stützen, wurde das *PIG-A* Gen sequenziert.



**Abbildung 7: *PIG-A* spezifische RT-PCR**

Elektrophoretische Auftrennung der Produkte einer *PIG-A* spezifischen PCR. Die Spuren sind die Negativkontrolle (1), die Positivkontrolle mit dem Plasmid pTO5 (2), Jurkat E.6-1 (3), Jurkat Klon 1 (4), Klon 2 (5) und Klon 7 (6). Als Molekulargewichtsreferenz wurde die 1-kb-Leiter aufgetragen.

Von den drei Klonen sowie der nicht mutagenisierten Jurkat E.6-1 Linie wurde Gesamt-RNA isoliert. Mit dem spezifischen Primer PIGRTAS wurde die RNA revers transkribiert und so die entsprechende cDNA erhalten. Mit dieser cDNA wurde dann mit den Primern PIGARIGH und KPN60 eine für *PIG-A* spezifische PCR durchgeführt und die amplifizierten Produkte auf einem präparativen Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 7). Das spezifische Amplifikat hatte eine Größe von etwa 1.550 bp, darüber hinaus wurden auch noch kürzere Fragmente amplifiziert, die sich auf Spleißvarianten zurückführen ließen (Yu et al. 1994). Die jeweils größten Fragmente wurden in den pGEM-T-Vektor kloniert. Diese Plasmide wurden dann für die Sequenzierung eingesetzt. Die eigentliche Sequenzierungsreaktion wurde mit dem Sequenase 2.0 Sequenzierungskit und sieben sequenzspezifischen Primern durchgeführt. Die Positionen der Amplifizierungs- und Sequenzierungsprimer sind in Abbildung 8 schematisch zusammengefaßt.



**Abbildung 8: Sequenzierung des *PIG-A* Gens**

Die *PIG-A* mRNA ist als Rechteck maßstabgetreu dargestellt; jeder Abschnitt dieses Rechtecks stellt ein Exon dar. Lediglich das Exon 6 wurde aufgrund seiner Größe verkürzt dargestellt. Der Primer PIGRTAS diente zur Herstellung der cDNA, die mit den Primern PIGARIGH und Kpn60 amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde kloniert und die Sequenz durch Verwendung von sieben Sequenzierprimern ermittelt. Die Länge der Pfeile gibt die ungefähre Leseweite der jeweiligen Sequenzierungsreaktion an.

Die Sequenzierung der Klone 2 und 7 ergab eine G zu A Transition an Pos. 144, in Klon 2 eine G zu A Transition an Pos. 1206 und in Klon 7 den Austausch eines G zu A an Pos. 1218 und eine Einzelbasendeletion, die zu einer Verschiebung des Leserasters und somit zu einem verfrühten Translationsstop führt.

Die reverse Transkription wie auch die PCR sind Reaktionen, die auch zu einem Falscheinbau einzelner Nukleinsäuren führen können. Aus diesem Grund wurden die Mutationen an Pos. 144 und die Einzelbasendeletion durch eine weitere Sequenzierung überprüft. Die sequenzierte cDNA stammte aus einer anderen RT-PCR-Klonierung, so daß ausgeschlossen werden konnte, daß nachträglich eingeführte Mutationen verschleppt wurden. Diese erneute Sequenzierung bestätigte die Mutationen an Pos. 144, jedoch ließ sich die Einzelbasendeletion nicht bestätigen. Um ganz sichere Aussagen über die Sequenzen treffen zu können, wurde aus den Klonen 2 und 7 genomische DNA isoliert und die jeweiligen Exons 2 und 3 über PCR mit den Primerpaaren PIGAEX2F und PIGAEX2R bzw. PIGAEX3F und PIGAEX3R amplifiziert. Nach Klonierung in den T-Vektor bestätigte die Sequenzierung das Ergebnis der zweiten Sequenzanalyse, nämlich den Basenaustausch an Pos. 144, wogegen die Einzelbasendeletion nicht gefunden wurde. Diese Mutation führte schließlich zu einem Austausch der Aminosäure 48 (G48D) des Pig-a Proteins von Gly zu Asp (siehe Abbildung 9). Da die Asparaginsäure die sauerste Aminosäure ist, ist auch vorstellbar, daß diese Mutation einen Einfluß auf funktionelle Parameter des Proteins hat.

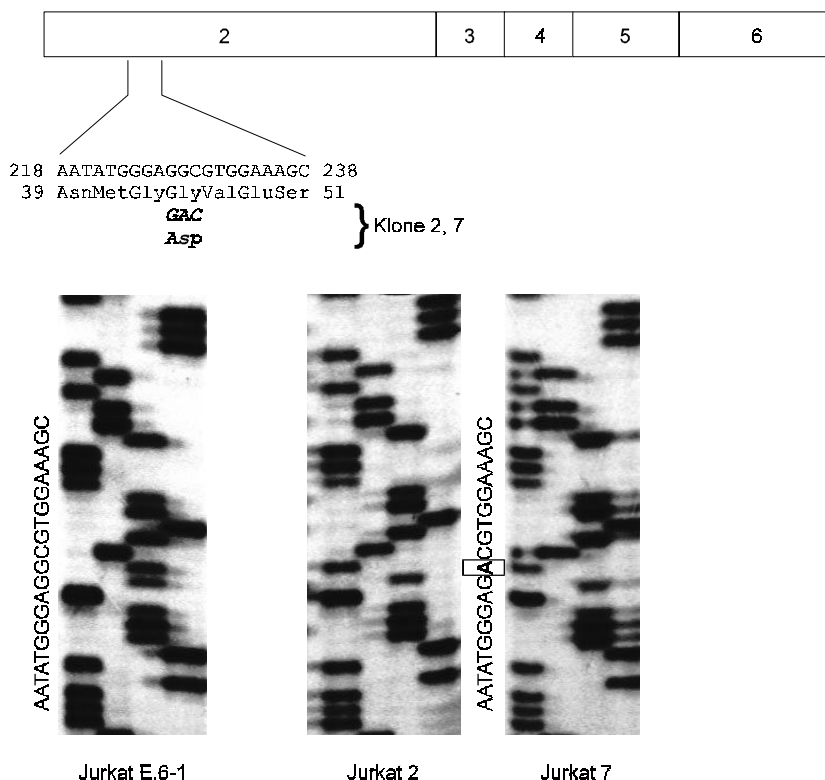
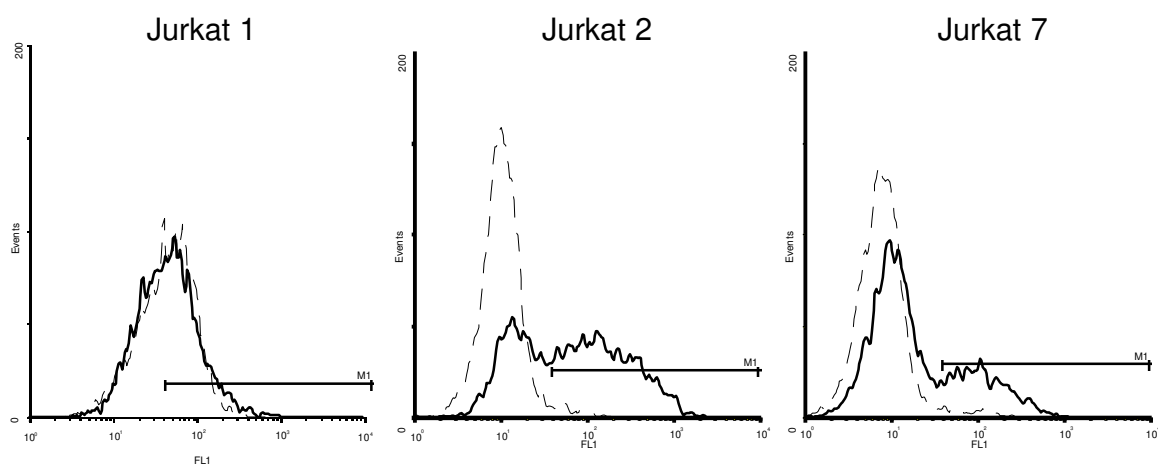


Abbildung 9: Darstellung der Mutationen in den Jurkat Klonen 2 und 7



### 3.1.2 Komplementierung des *PIG-A* Defektes

Einzelne Aminosäureaustausche, selbst wenn sie zwei sehr unterschiedliche Aminosäuren betreffen, müssen nicht zwangsläufig zum Funktionsverlust eines Proteins führen. Um im Fall der hier genannten Zellen sicherzugehen, daß der Defekt in der GPI-Biosynthese tatsächlich auf ein inaktives Pig-a Protein zurückzuführen ist, wurde das *PIG-A* Gen in die Zellen transfiziert. Sollte der Defekt nicht von dem mutierten *PIG-A* Gen ausgehen, sollte eine Transfektion mit dem Wildtyp *PIG-A* Gen keinen Einfluß haben. Der Vektor pL-*PIGA*-SN (siehe Abschnitt 3.2.1.1) wurde mit Elektroporation in die hier beschriebenen Mutanten transfiziert; nach 7 Tagen Selektion in G418 wurden die Zellen durchflußzytometrisch untersucht, nachdem sie mit dem CD48-spezifischen Antikörper MEM102 inkubiert wurden. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 10 dargestellt. Die reduzierte Expression von CD48, die auf Klon 1 gemessen wurde, ließ sich nicht durch Transfektion mit diesem Vektor erhöhen. Bei den Klonen 2 und 7 konnte nach der Transfektion eine Subpopulation nachgewiesen werden, die das CD48 auf der Zelloberfläche exprimiert.



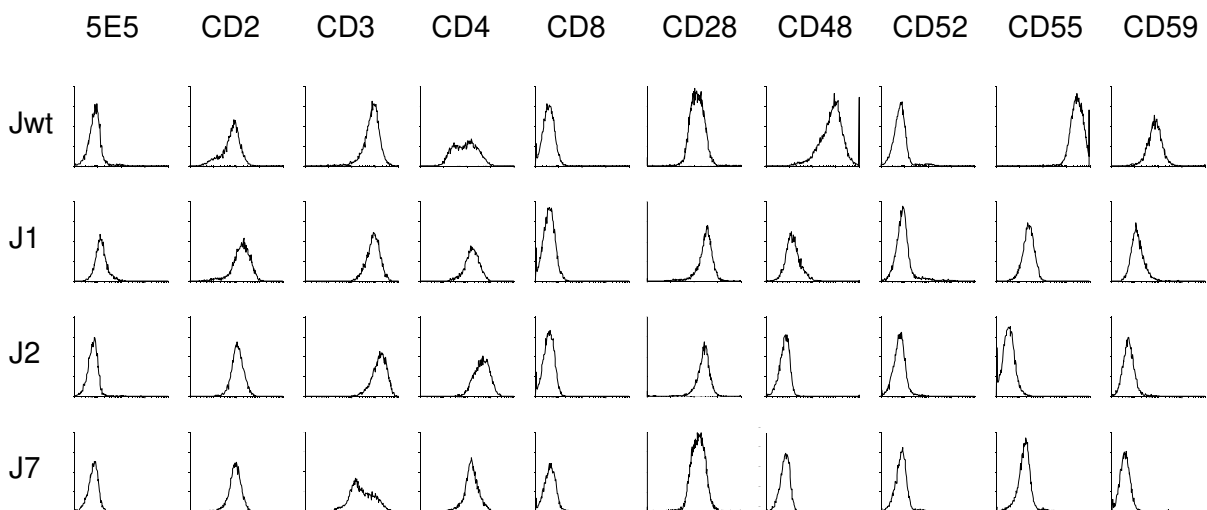
**Abbildung 10: Transiente Expression des Wildtyp *PIG-A* Gens in den Jurkat-Mutanten**

Je  $5 \times 10^6$  Zellen der Klone 1, 2 und 7 wurden mit je  $20 \mu\text{g}$  pL-*PIGA*-SN transfiziert. Nach 7 Tagen in Kulturmedium mit  $750 \mu\text{g/ml}$  G418 wurden die Zellen mit dem mAk MEM-102 und GAM-FITC als Sekundärantikörper markiert. Die durchgängigen Linien zeigen die transfizierten Zellen. Die gestrichelte Linie zeigt nicht transfizierte Zellen. Transfektion des Klons 1 zeigte keine höhere Expression des GPI-verankerten CD48, während die Klone 2 (60 %) und 7 (28 %) eine Subpopulationen zeigten, die das CD48 auf der Zelloberfläche trugen.

### 3.1.3 Funktionelle Untersuchungen

#### 3.1.3.1 Charakterisierung vorhandener Antigene

Die Jurkat-Zellen stellten einen sehr zentralen Punkt dieser Arbeit dar, da an ihnen erprobt werden sollte, ob und wie gut die Expression der Vektoren war. Aus diesem Grunde war es unvermeidlich, die Klone auch über den offensichtlich benötigten Grad hinaus zu charakterisieren. Da es sich bei der Jurkat Linie um eine T-Zell-Lymphom Linie handelt, wurden die Zellen mit sämtlichen vorhandenen T-Zell relevanten Antikörpern markiert. Wie man in Abbildung 11 sehen kann, sind alle Zellen  $CD2^+CD3^+CD4^+CD8^-CD28^+CD52^-$ . Die verschiedenen Klone unterscheiden sich nur in der Expression von CD55, CD59 und CD48. Die Ausgangslinie exprimiert diese drei Antigene, Klon 1 ist  $CD48^loCD55^loCD59^lo$  und die Klone 2 und 7  $CD48^-CD55^-CD59^-$ .



**Abbildung 11: Phänotypische Analyse der Jurkat-Klone**

Durchflußzytometrische Charakterisierung der Jurkat-Linie E.6-1 sowie der Mutanten Klone 1, 2 und 7. Die Zellen sind  $CD2^+CD3^+CD4^+CD8^-CD28^+CD52^-$ . Sie unterscheiden sich nur in der Expression der GPI-verankerten Antigene CD48, CD55 und CD59. Der in der ersten Spalte angeführte mAk diente als Negativkontrolle.

### 3.1.3.2 Untersuchungen zu Wachstum und Apoptose

Eine kürzlich erschienene Arbeit beschrieb einen Zusammenhang zwischen GPI-Verankerung und Apoptose (Brodsky et al. 1997). Sollte das Vorhandensein von GPI-Ankern irgendeinen Einfluß auf das Wachstum der Zellen, insbesondere unter Selektion, haben, so könnte dies in ungewollter Art und Weise den Verlauf des Projektes beeinflussen. Deshalb wurden die Klone mit verschiedenen Methoden auf das Verhalten nach Apoptoseinduktion getestet. Die hier verwendeten Zellen waren stabil transduzierte Zellen, deren Herstellung erst in einem späteren Abschnitt behandelt wird. Zum einen wurden die Zellen J7P verwendet; hier handelte es sich um mit L-*PIGA*-SN stabil transduzierte, also GPI-Anker exprimierende, Klon 7 Zellen. Zum anderen wurden Zellen J7X als Kontrolle verwendet. Diese Zellen waren ebenfalls Klon 7 Zellen, die mit dem 'leeren' Vektor LXS<sub>N</sub>, also ohne *PIG-A*, transduziert wurden und somit auch nicht über GPI-Anker verfügten.

#### 3.1.3.2.1 Wachstum in serumfreien Medium

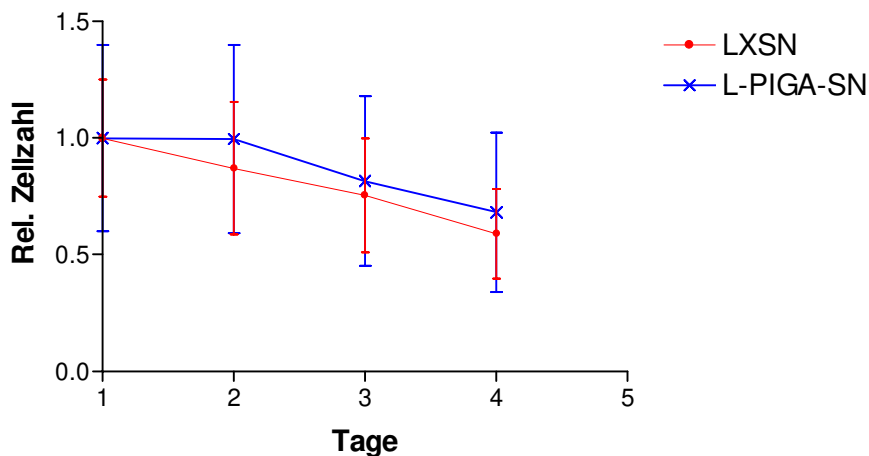
In diesem Versuch sollte der Unterschied zwischen GPI<sup>+</sup>- und GPI<sup>-</sup>-Zellen durch Induktion der Apoptose durch das 'Aushungern' in serumfreien RPMI-Medium untersucht werden. Hierzu wurden jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen/ml LXS<sub>N</sub>- und L-*PIGA*-SN-transduzierten Jurkat 7 Zellen in normalem RPMI-Medium, jedoch ohne Zytokine, für 4 Tage inkubiert. Täglich wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Um Ungenauigkeiten auszugleichen, die durch die Zählprozedur entstanden, wurden gleiche Ansätze parallel durchgeführt. Das Ergebnis der einzelnen Auszählungen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Während des Versuchszeitraums nahm der Titer der Zellkulturen stetig ab. Um die Änderungen der Zellkonzentrationen gegenüberstellen zu können, wurden an den jeweiligen Tagen aus den zusammengehörigen Ansätzen die Mittelwerte gebildet und in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen (Abbildung 12). Das Diagramm zeigt, daß der Serum-entzug zu einem Rückgang der Zellzahl führte. Ein Unterschied in der Abnahme des Zelltiters war jedoch zwischen den beiden Zelltypen nicht feststellbar. Dieser Versuch zeigte, daß GPI-Defizienz keine Vor- oder Nachteile für das Wachstum der Zellen bzw. auf Induktion der Apoptose *in vitro* zeigt.

**Tabelle 2: Verlauf der Lebendtitel bei Inkubation von Jurkat 7 (J7X und J7P) in serumfreien Medium.**

| Zellen              | Tag   | Ansatz 1          | Ansatz 2          | Ansatz 3          | Ansatz 4          | Ansatz 5          | Ansatz 6          |
|---------------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| J7X                 | Tag 1 | $9,6 \times 10^4$ | $8,8 \times 10^4$ | $7,6 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^5$ | $1,1 \times 10^5$ | $1,2 \times 10^5$ |
| (GPI <sup>-</sup> ) | Tag 2 | $9,6 \times 10^4$ | $8,0 \times 10^4$ | $6,0 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^5$ | $8,5 \times 10^4$ | $8,8 \times 10^4$ |
|                     | Tag 3 | $7,4 \times 10^4$ | $6,3 \times 10^4$ | $4,8 \times 10^4$ | $1,2 \times 10^5$ | $8,0 \times 10^4$ | $9,9 \times 10^4$ |
|                     | Tag 4 | $6,8 \times 10^4$ | $5,0 \times 10^4$ | $4,6 \times 10^4$ | $1,0 \times 10^5$ | $4,8 \times 10^4$ | $6,5 \times 10^4$ |
| J7P                 | Tag 1 | $7,6 \times 10^4$ | $4,9 \times 10^4$ | $5,8 \times 10^4$ | $3,6 \times 10^5$ | $2,8 \times 10^5$ |                   |
| (GPI <sup>+</sup> ) | Tag 2 | $8,5 \times 10^4$ | $5,2 \times 10^4$ | $4,8 \times 10^4$ | $3,9 \times 10^5$ | $2,8 \times 10^5$ |                   |
|                     | Tag 3 | $4,5 \times 10^4$ | $3,7 \times 10^4$ | $3,4 \times 10^4$ | $3,2 \times 10^5$ | $2,7 \times 10^5$ |                   |
|                     | Tag 4 | $2,5 \times 10^4$ | $2,5 \times 10^4$ | $1,7 \times 10^4$ | $2,9 \times 10^5$ | $2,3 \times 10^5$ |                   |

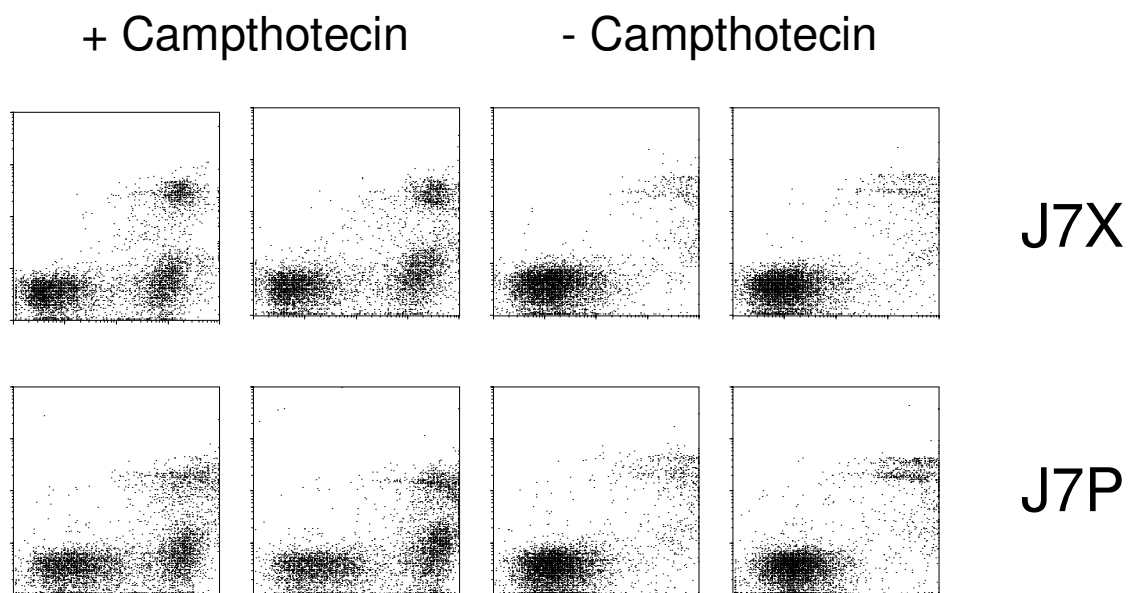
In fünf bzw. sechs Experimenten wurde durch tägliche Bestimmung der Lebendtitel der Einfluß von Serumentzug auf das Wachstum von mit LXS<sub>N</sub> oder L-PIGA-S<sub>N</sub> transduzierten Jurkat 7 Zellen, also GPI-negativen und GPI-positiven Zellen, bestimmt. Jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen/ml wurden in RPMI1640 mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in feuchter Atmosphäre inkubiert.

**Abbildung 12: Apoptose durch Serumentzug**

Relative Lebendzellzahl von LXS<sub>N</sub>- und L-PIGA-S<sub>N</sub>-transduzierten Jurkat 7 Zellen im Verlauf von 4 Tagen durch 'Aus-hungern' mittels Serumentzug. Die Meßpunkte geben die Mittelwerte der Zelltitelbestimmung an den jeweiligen Tagen an. Die Balken geben die Standardabweichung an.

### 3.1.3.2.2 *Camptothecin* induzierte Apoptose

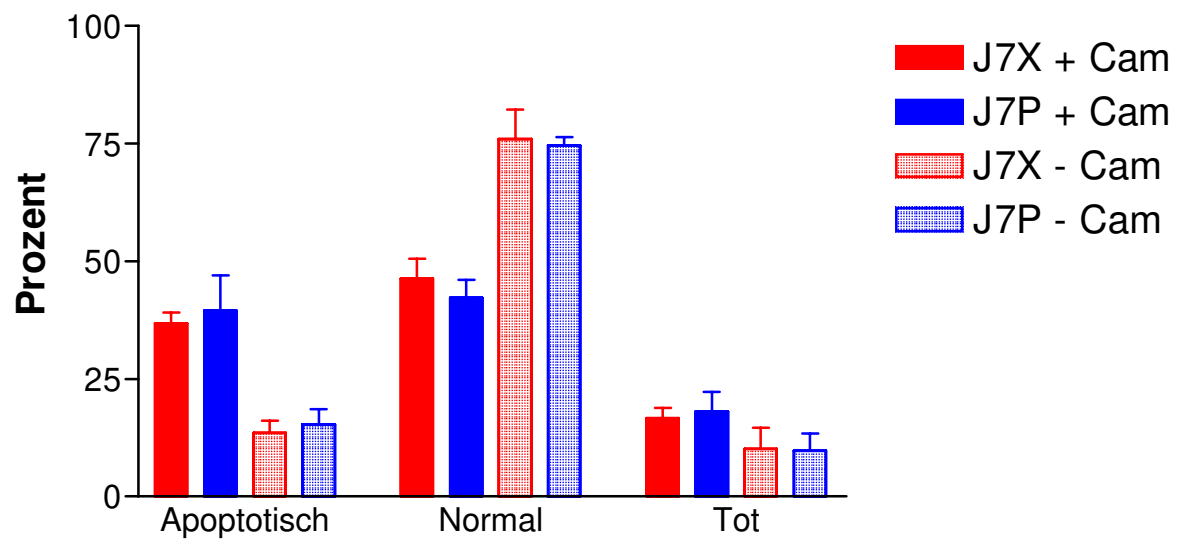
Ein klassischer Weg, Apoptose zu induzieren, ist die Inkubation von Zellen mit dem Camptothecin. Dieses Cytostatikum ist ein potenter Topoisomerasehemmer, der Zellen innerhalb kurzer Zeit zur Apoptose bringt. Die Apoptose wurde in diesem Fall über die Bindung von PE-konjugiertem Annexin V an Phosphatidylserin gemessen. Phosphatidylserin ist ein Bestandteil der Zellmembran, der sich normalerweise auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet. Durchläuft eine Zelle allerdings das Programm der Apoptose, wird Phosphatidylserin an die Oberfläche transloziert. Zellen, die bereits tot sind, exprimieren ebenfalls Phosphatidylserin auf der Oberfläche. Zur Unterscheidung der toten von den apoptotischen Zellen wurden sie zusätzlich noch mit 7-AAD inkubiert, einem Farbstoff, der nur tote Zellen anfärbt.



**Abbildung 13: Apoptose-Induktion mit Camptothecin**

Die beiden linken Felder zeigen die Zellen nach Inkubation mit Camptothecin, die beiden rechten Felder zeigen die korrespondierenden Kontrollen. Die oberen Felder zeigen die GPI-defizienten J7X, die beiden unteren Felder die GPI-positiven J7P-Zellen. Die X-Achse zeigt die Bindung des PE-konjugierten Annexin V, die Y-Achse die Färbung mit 7-AAD.

In diesem Versuch wurden je vier unabhängig kultivierte Ansätze von transduzierten GPI-positiven (J7P) und -negativen (J7X) Jurkat 7 Zellen verglichen. Die Ansätze wurden in zwei Hälften aufgeteilt. Die eine wurde mit 200 ng/ml Camptothecin für 2 Std. inkubiert, die andere wurde genauso behandelt, jedoch ohne Camptothecin. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Annexin V und 7-AAD gefärbt und im FACS gemessen.



**Abbildung 14: Apoptose-Induktion mit Camptothecin**

Statistische Auswertung der Messungen aus Abbildung 13. Die Säulen geben die Mittelwerte von jeweils vier Messungen an.

Die Messungen zeigen keine offensichtlichen Unterschiede in Bezug auf die Reaktion der Zellen auf die Induktion der Apoptose. Unterschiede, die zwischen GPI-positiven und GPI-negativen Zellen bestehen, sind sowohl in den Camptothecin-induzierten als auch in den Kontrollen zu beobachten und stellen somit keinen unterschiedliche Antwort dar.

## 3.2 Herstellung retroviraler Vektoren

### 3.2.1 Vektorklonierungen

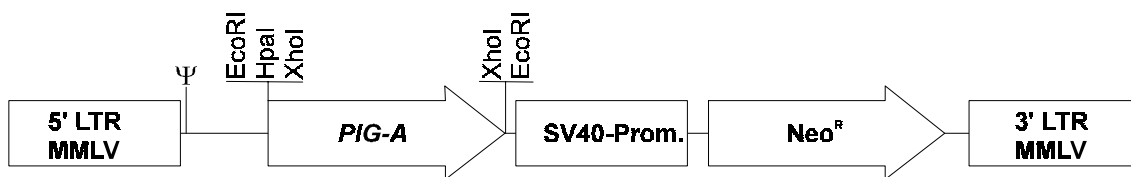
Ein wichtiger Punkt bei der Planung und Durchführung eines retroviralen Gentransfers ist die Wahl des richtigen Vektors. Von der Konstruktion des Vektors kann die Stärke und die Stabilität der Expression der transduzierten Gene abhängen. Die Vektorkonstruktion nimmt aber auch direkten Einfluß auf den Virustiter, weil Sequenzabschnitte, die auf solchen Vektoren liegen, als Verpackungssignal fungieren. Es gibt darüber hinaus auch Beschränkungen, welche Größe einklonierte Fragmente haben dürfen, damit sie noch in Viruspartikel verpackt werden können.

Die ursprünglich von Miller beschriebenen Vektoren basieren, genau wie die Verpackungszellen, auf dem M-MLV, dem murinen Leukämievirus. Die Vektoren haben als Rückgrat die Sequenz dieses Virus, nur, daß die Strukturgene entfernt wurden. Statt dessen beinhalten diese Vektoren einklonierte Gene und regulatorische Elemente. In solchen Vektoren steht die Genregulation im allgemeinen unter der Kontrolle des 5'-LTR, das üblicherweise für eine effiziente Transkription viraler RNA verantwortlich ist. Diese Vektoren wurden immer wieder modifiziert und weiterentwickelt. Bei der Klonierung der im folgenden beschriebenen Vektoren wurde ein Teil dieser Weiterentwicklungen angewendet.

#### 3.2.1.1 pL-PIGA-SN

Als Ausgangsplasmid zur Klonierung dieses Vektors diente der retrovirale Vektor pLXSN (Miller and Rosman 1989), der ursprüngliche Standardvektor für diese Vektortypen. Es handelt sich bei diesem Vektor um einen der ersten der Miller'schen Vektoren, basierend auf dem M-MLV. Er zeichnet sich durch eine gute Expression und hohe Virustiter aus und wird nach wie vor von vielen Arbeitsgruppen verwendet. Dieses Plasmid hat eine *multi-cloning-site* nach dem 5'-LTR, so daß ein dort inseriertes Gen unter der Transkriptionskontrolle des 5'-LTR steht. Der *multi-cloning-site* schließt sich der frühe Promotor des SV40 an, der die Transkription des Neomycin-Resistenzgenes steuert, das als selektionierbares Markergen fungiert.

Der kodierende Bereich des *PIG-A* Gens wurde mittels PCR unter der Verwendung der beiden Primer PIGALEFT und PIGARIGH aus dem Plasmid pTO5 amplifiziert, das die komplette cDNA enthält. Diese Primer generierten an beiden Enden des Amplifikates eine XhoI Restriktionsstelle. Vektor und Amplifikat wurden mit XhoI restringiert und der Vektor zusätzlich noch dephosphoryliert. Anschließend wurden beide ligiert, die Orientierung des Inserts überprüft und das *PIG-A* Gen sequenziert, um auszuschließen, daß durch die PCR Mutationen eingeführt wurden. Eine schematische Darstellung des Vektors ist in Abbildung 15 zu sehen.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung des Vektors pL-PIGA-SN.**

Dieser Vektor trägt 5' und 3' die LTR-Sequenzen des M-MLV. Dazwischen liegen (von 5' nach 3') das Verpackungssignal  $\Psi$ , die über XhoI einklonierte kodierende Sequenz des *PIG-A* Gens, der frühe Promotor des SV40, der die Transkription des nachgeschalteten Neomycin-Resistenzgens steuert. Die Transkriptionssteuerung des *PIG-A* Gens erfolgt hier über die Promotor/Enhancer-Elemente des 5'-LTR.

### 3.2.1.2 pLPIN

Bei Vektoren, wie dem pL-PIGA-SN, bei dem zwei Promotoren eng benachbart sind, kann es zu Interferenzen der beiden Promotoren führen. Das kann dazu führen, daß eine effektive Transkription gehemmt wird. Eine Strategie, solche Wechselwirkungen zu umgehen, wurde bei der Klonierung des nachfolgenden bicistronischen Vektors umgesetzt. Der Vektor wurde so konstruiert, daß beide Gene, also *PIG-A* und Neo-Resistenz, so liegen, daß sie unter der Kontrolle des M-MLV-5'-LTR als ein Transkript abgeschrieben werden. Eine interne Ribosomenbindungsstelle (IRES), die zwischen den beiden Genen (Cistrons) liegt, ermöglicht, daß von diesem einen Transkript zwei Proteine translatiert werden. Das Rückgrat dieses Vektors bildete das Plasmid pLXPXSN (W. F. Anderson). Dieser retrovirale Vektor ist für die Klonierung bicistronischer Vektoren gedacht. An das 5'-LTR schließt sich eine *multi-cloning-site* an. Nach einer Polio-IRES



Sequenz schließt sich eine weitere *multi-cloning-site* an. Zur Selektion in Eukaryontenzellen befindet sich unmittelbar vor dem 3'-LTR ein SV40-Promotor, der ein Neomycin-Resistenzgen steuert.

Das Ziel war es, einen bicistronischen retroviralen Vektor zu klonieren, bei dem das *PIG-A* Gen und das Neomycin-Resistenzgen durch die Polio-IRES verbunden unter der Kontrolle des M-MLV-LTR Promotors standen. Hierzu wurde das Vektorplasmid mit *Xho*I und *Bcl*II restringiert, die überhängenden Enden wurden mit dem Klenow-Enzym aufgefüllt und das Plasmid ligiert. Das Plasmid wurde daraufhin mit *Eco*72I restringiert und dephosphoryliert. Aus dem oben beschriebenen Vektor pL-*PIGA*-SN wurde das *PIG-A* Gen mit *Xho*I ausgeschnitten, die überhängenden Einzelstrangenden wurden aufgefüllt, das ca. 1,5 kbp lange Fragment gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach der Gelextraktion mit dem Vektor ligiert. Ein Schema der Konstruktion sowie eine Skizze des Vektors ist in Abbildung 16 dargestellt.

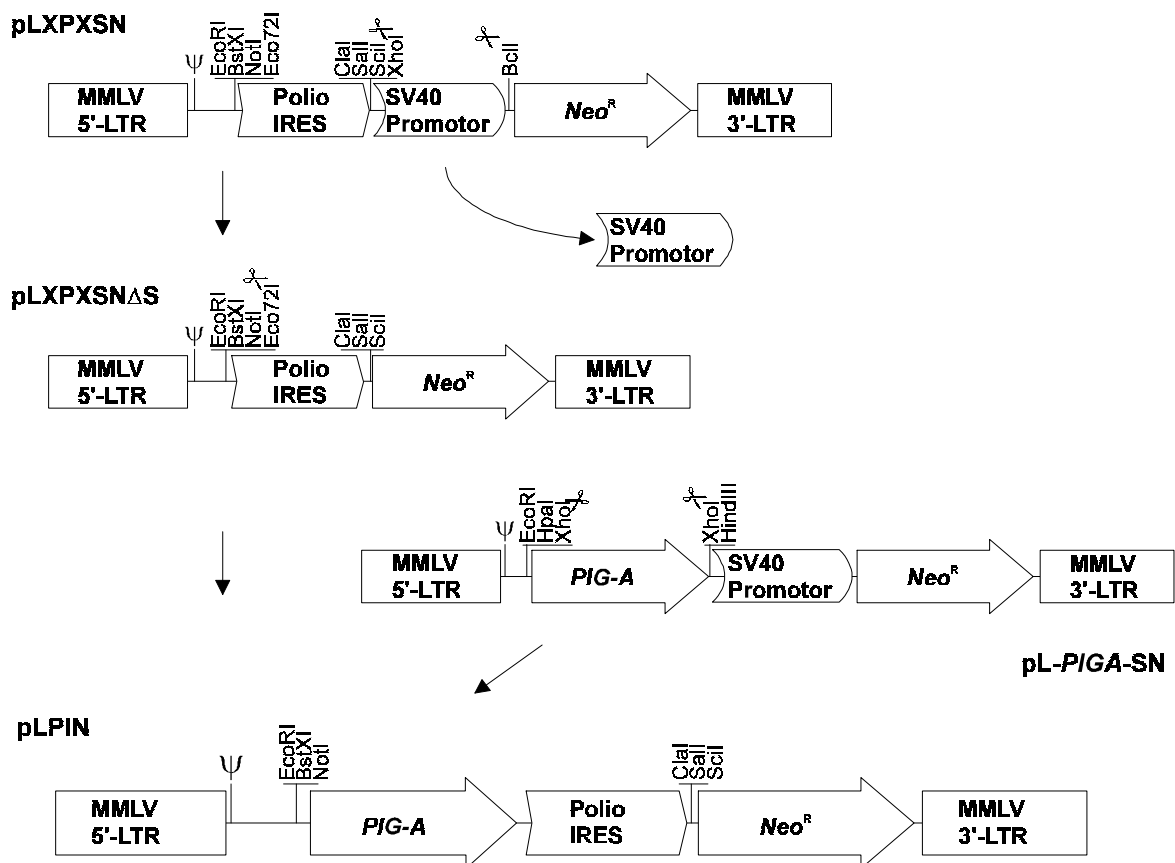


Abbildung 16: Die Klonierung des retroviralen Vektors pLPIN

### 3.2.1.3 pSNIP

Genau wie bei dem Vektor pLPIN sollte auch hier ein bicistronischer Vektor kloniert werden. Als Rückgrat sollte allerdings nicht ein auf dem M-MLV basierender Vektor dienen, sondern der Vektor pSF $\beta$ 1N (Baum et al. 1995). Es handelt sich hier um einen chimären Vektor, bei dem viele Sequenzabschnitte des M-MLV gegen die anderer Retroviren ausgetauscht wurden. Diese Art von Vektoren zeichnet sich durch eine höhere Sicherheit aus, da sie nur noch wenige Homologien zu dem Wildtyp M-MLV haben und somit die Wahrscheinlichkeit von Rekombinationen drastisch herabgesetzt wurde. Des weiteren regulierten die Kontrollelemente, die in diesen Vektor neu eingeführt wurden, die Expression derart, daß auch eine gute Expression in myeloiden und erythroiden Zellen erreicht wurde (Eckert et al. 1996), während reine M-MLV Vektoren lediglich eine gute Expression in Lymphozyten zeigten (Baum et al. 1996). Das 5'-LTR ist aus PCMV, einer Variante des myeloproliferativen Sarkomavirus (MPSV), die durch Passagieren in der Zelllinie PCC4 eine verstärkte Expression in primitiveren Zellen gezeigt hat. Der sich dem 5'-LTR anschließende *leader*, der auch die *primer binding site* (PBS) enthält, ist aus dem murinen embryonalen Stammzellvirus (MESV). Daran schließt sich das Neomycin-Resistenzgen an, das auf beiden Seiten von mehreren Restriktionsstellen flankiert ist. Das 3'-LTR besteht schließlich aus einer Sequenz des polycythemischen *spleen focus-forming virus* (SFFVp), einer Variante des *Friend mink cell focus-forming virus* (FMCF). Diese Sequenz, die bei der Integration des Provirus in den Zielzellen nach 5' kopiert wird, hat in vergleichenden Untersuchungen mehrerer LTR-*enhancer* die beste Expression in hämatopoetischen Zellen gezeigt (Eckert et al. 1996).

Um die Polio-IRES und das *PIG-A* Gen hinter das Neomycin Resistenzgen des Vektors zu klonieren, mußten einige sequentielle Klonierungen vorgenommen werden, die in Abbildung 17 zusammengefaßt sind. Zuerst wurde die IRES-Sequenz aus dem oben beschriebenen Vektor pLXPXSN durch Restriktion mit EcoRI und XhoI herausgeschnitten und in einen gleichartig restringierten pBluescript KS (+)-Vektor hineinligiert. Der so erhaltene Vektor wurde mit XhoI verdaut und dephosphoryliert. Zur gleichen Zeit wurde der Vektor pL-*PIGA*-SN ebenfalls mit XhoI verdaut, das 1,5 kbp-Fragment elektrophoretisch aufgetrennt und in den Vektor ligiert. Nach Überprüfung der Orientierung des *PIG-A* Gens wurde dieser Vektor mit ApaI und anschließend partiell mit BamHI restringiert, um das 2,2 kbp IRES-*PIG-A* Fragment auszuschneiden. Nach Gelextraktion wurde dieses Frag-

ment in ein mit BamHI und ApaI restringierten pGem-11Zf(+) Vektor ligiert. Der so generierte Vektor wurde dann partiell mit BamHI und partiell mit HindIII gespalten, die Restriktionsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt und das gewünschte Fragment aus dem Gel extrahiert. Der Vektor pSFβ1N wurde ebenfalls mit BamHI und HindIII verdaut, so daß das IRES-*PIG-A* Fragment gerichtet in den Vektor kloniert wurde.

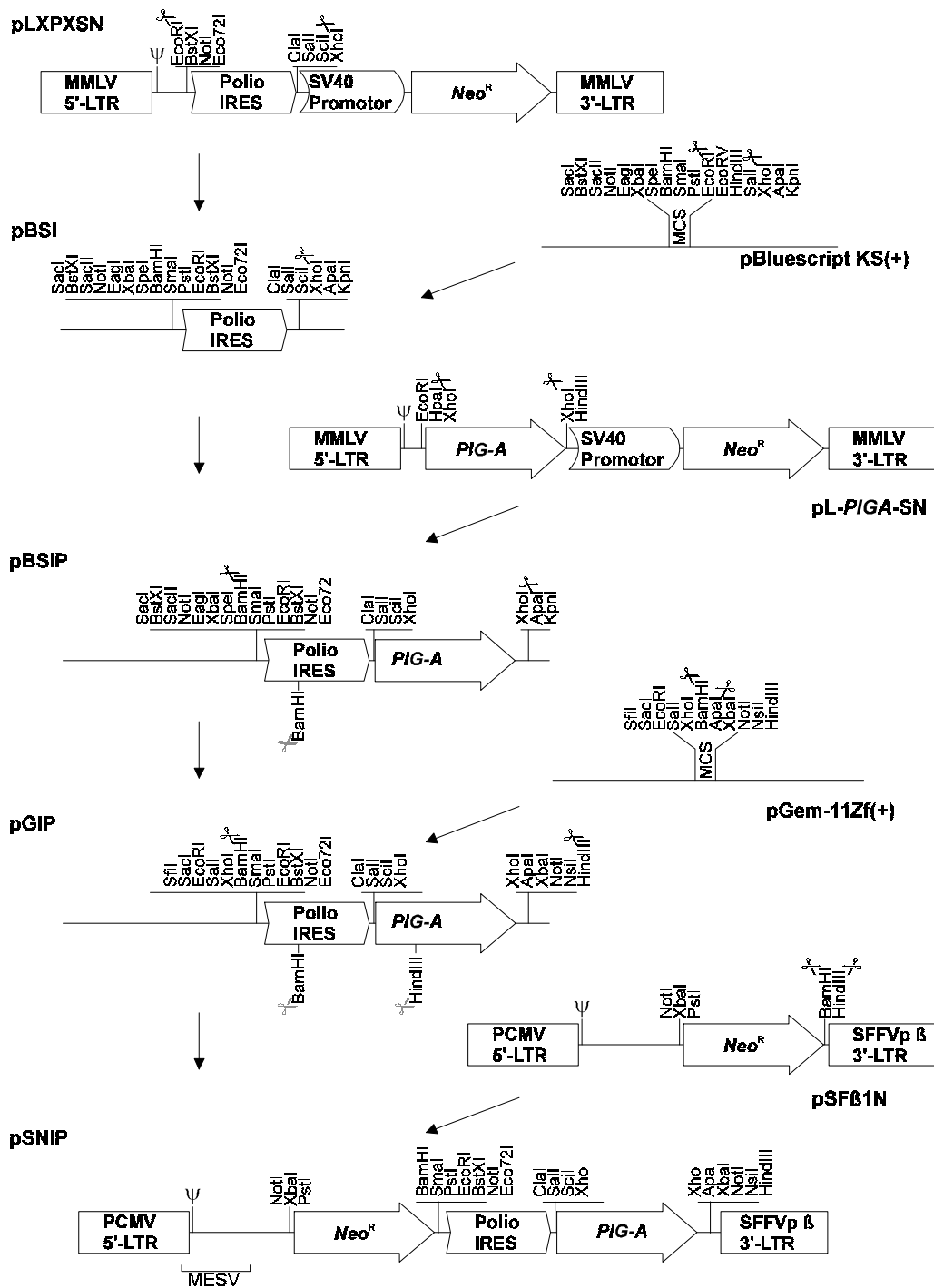
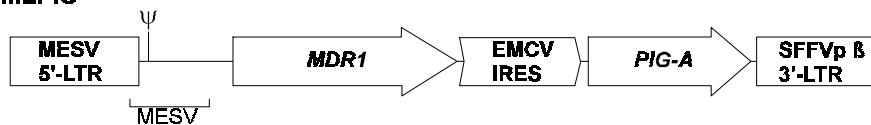


Abbildung 17: Klonierung des retroviralen Vektors pSNIP

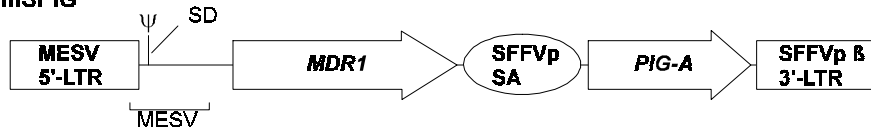
### 3.2.1.4 FMEV Vektoren mit MDR1 als Selektionsmarker

Die nachfolgend beschriebenen Vektoren sind, wie der oben beschriebene pSF $\beta$ 1N, Vektoren des chimären FMEV Typs. Diese Vektoren wurden von C. Baum und M. Hildinger vom Heinrich-Pette-Institut in Hamburg kloniert. Ziel war es, Vektoren zur Verfügung zu haben, die sowohl in Zellkultur als auch *in vivo* selektionierbar sind (Sorrentino et al. 1992). Um einen guten Vektor auswählen zu können, wurden verschiedene Konstrukte hergestellt, bei welchen das *PIG-A* Gen jeweils anders transkriptionell reguliert ist. Das *MDR1* Gen als Selektionsmarker steht immer unter der Kontrolle des 5'-LTR. Eine schematische Darstellung der Vektoren ist in Abbildung 18 zusammengefaßt.

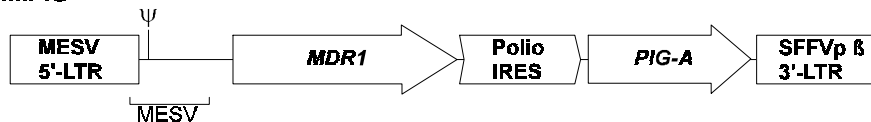
#### pSF $\beta$ 1mEPIG



#### pSF $\beta$ 1mSPIG



#### pSF $\beta$ 1mIPIG



#### pSF $\beta$ 1mBPIG

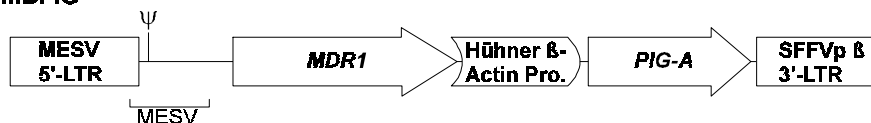


Abbildung 18: FMEV-Vektoren

#### 3.2.1.4.1 pSF $\beta$ 1mEPIG

Es handelt sich hier um einen bicistronischen Vektor, bei dem das *MDR1* und das *PIG-A* Gen auf einem Cistron liegen. Beide sind über eine IRES-Sequenz des Encephalomyo-

carditisvirus (EMCV) verbunden. Im Gegensatz zur IRES des Poliovirus, bei dem die exakte Positionierung des nachfolgenden Genes nicht ganz so wichtig ist, muß in diesem Fall das *PIG-A* Gen genau im Leseraster der IRES liegen.

#### 3.2.1.4.2 *pSFβ1mSPIG*

Dieser Vektor hat im Bereich der leader-Sequenz noch die retrovirale Donor-Spleißstelle. Unmittelbar vor dem *PIG-A* Gen befindet sich die zugehörige Spleißakzeptorstelle. Das führt dazu, daß je nachdem, ob ein Spleißen stattfindet oder nicht, nur jeweils eines der beiden Gene abgelesen werden kann. Aufgrund dieser Konstruktion läßt sich allerdings keine Vorhersage treffen, in welchen Relationen die beiden Gene abgelesen werden.

#### 3.2.1.4.3 *pSFβ1mIPIG*

Dieser bicistronische Vektor ähnelt in seinem Aufbau dem Vektor pSNIP. Lediglich das Neomycin-Resistenzgen ist durch das *MDR1* Gen ausgetauscht. Alle weiteren Unterschiede in der Vektorsequenz sind klonierungsbedingt.

#### 3.2.1.4.4 *pSFβ1mBPIG*

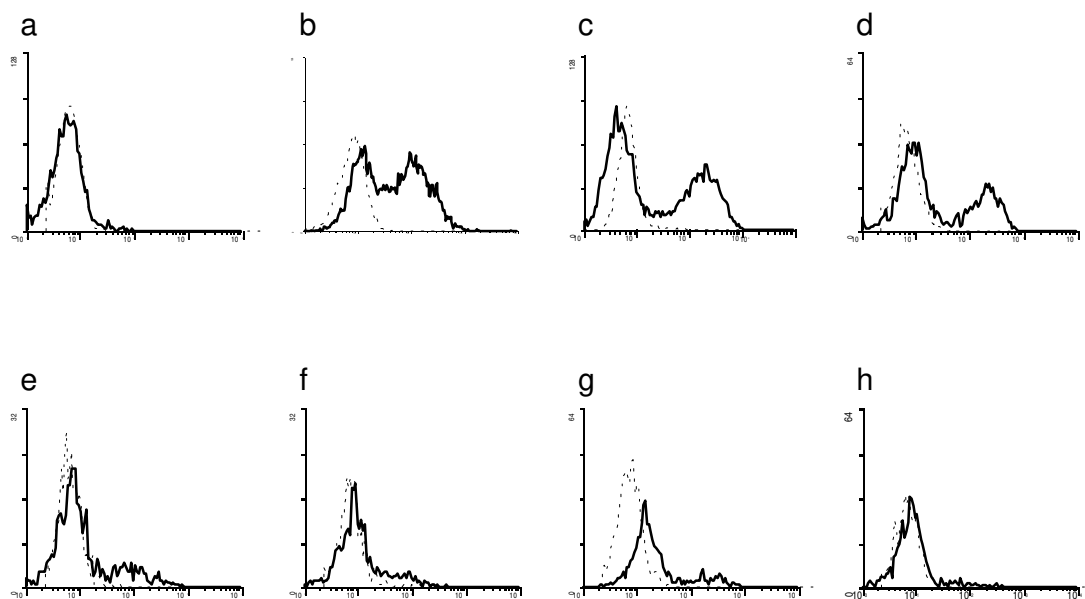
Bei diesem Vektor steht die Transkription des *PIG-A* Gens unter der Kontrolle des heterologen Beta-Aktin Promotors aus dem Huhn, einem starken und konstitutiven Promotor.

### 3.2.1.5 Überprüfung der Vektoren durch transiente Expression in GPI-defizienten Jurkat-Zellen

Vor der Herstellung rekombinanter Retroviren, die die oben genannten Vektoren beinhalten sollen, wurden die Vektoren durch Transfektion transient in den GPI-defizienten Jurkat 7 Zellen exprimiert. Dadurch sollte, für den Fall, daß keine Expression nachzuweisen war, das zeitaufwendige Screening von transfizierten bzw. transduzierten Ver-

packungszellen gespart werden. Das Vektorplasmid sollte den gleichen Regulationen unterliegen wie die provirale Sequenz und somit im Falle des Funktionierens in jedem Fall nachweisbar sein.

Über Elektroporation wurde die Plasmid-DNA in die Zellen transfiziert. Nach zwei bis vier Tagen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen GPI-verankerte Antigene markiert und durchflußzytometrisch untersucht. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 19 dargestellt. Die FACS-Analyse ergab, daß alle mit Vektoren transfizierten Zellen eine zumindest teilweise Expression von CD59 zeigten. Die MOCK-transfizierten Zellen hingegen zeigten keine Reexpression von CD59 auf der Zelloberfläche. Es war auffällig, daß die MDR-enhaltenden FMEV-Vektoren mit einer sehr niedrigen Effizienz transfiziert wurden (2 - 13 %), während die Vektoren mit der Neomycin-Resistenz sehr gut transfizierbar waren (30 - 55 %).



**Abbildung 19: Überprüfung der Vektorkonstrukte durch Transfektion**

Die Histogramme zeigen die CD59-Expression von transient transfizierten Jurkat 7 Zellen (geschlossene Kurve). Die Isotypkontrollen sind gepunktet dargestellt. Jurkat 7 Zellen wurden mit Elektroporation transfiziert mit MOCK (a), pL-PIGA-SN (b), pSNIP, (c), pLPIN (d), pSFβ1mEPIG (e), pSFβ1mSPIG (f), pSFβ1mIPIG (g) und pSFβ1mBPIG (h).

### 3.3 Stimulation von CD34<sup>+</sup>-Knochenmarkvorläuferzellen

Der retrovirale Gentransfer in hämatopoetische Zellen erfolgt mit dem Ziel, möglichst undifferenzierte und nicht determinierte Vorläuferzellen oder die sog. pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen zu transduzieren. Die höchste Konzentration dieser Zellen findet man im Knochenmark. Durch Behandlung mit G-CSF, alleine oder in Kombination mit anderen Wachstumsfaktoren, kann es zu einer Mobilisierung eben dieser frühen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut kommen. Diese frühesten Zellen zeichnen sich durch ein bestimmtes Spektrum an Oberflächenantigenen aus. Sowohl die Knochenmarkstammzellen (Hao et al. 1995, Terstappen et al. 1991) als auch die mobilisierten Stammzellen (Uchida et al. 1997) des peripheren Blutes befinden sich außerdem zum größten Teil in der G<sub>0</sub> Phase des Zellzyklus. Deshalb sind diese Zellen einem retroviralen Gentransfer wenig zugänglich, da sich Zellen für die Transduktion in Teilung befinden müssen (Miller et al. 1990).

Hämatopoetische Zellen, auch die Vorläufer- und Stammzellen, lassen sich durch Zytokine und Wachstumsfaktoren zur Zellteilung anregen, was zum einen zu einer Induktion von Differenzierungsprozessen führen kann. Zum anderen kann sich eine Vorläuferzelle in zwei gleiche Nachkommen teilen, die beide das gleiche Potential zur Generierung verschiedener Linien von Blutzellen haben. Bisher ist die Wechselwirkung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen mit ihrer Umgebung, d. h. den angrenzenden Zellen und den löslichen Wachstums- und Signalstoffen noch nicht vollständig verstanden. Es sind zwar viele der Substanzen bekannt, die mit den primitivsten und auch den weiter determinierten hämatopoetischen Zellen interagieren, aber die Wechselwirkungen dieser Faktoren untereinander ist bisher noch sehr wenig verstanden.

Ein Teil dieser Arbeit befaßte sich mit der Suche nach einem System, das es ermöglicht, hämatopoetische Zellen, insbesondere die unreifen sich selbst erneuernden, derart zu stimulieren, daß sie proliferieren, aber nicht ihre Pluripotenz, also die Fähigkeit, die verschiedenen Linien des hämatopoetischen Systems zu generieren, verlieren. Um dies zu untersuchen, wurden mobilisierte Stammzellen und auch Knochenmarkstammzellen für CD34<sup>+</sup>-Zellen angereichert und in geeigneten Medien in Anwesenheit verschiedener Kombinationen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren inkubiert. Es galt bei diesen Experimenten besonders eine Kulturzeit von zwei bis sieben Tagen zu beobachten, da

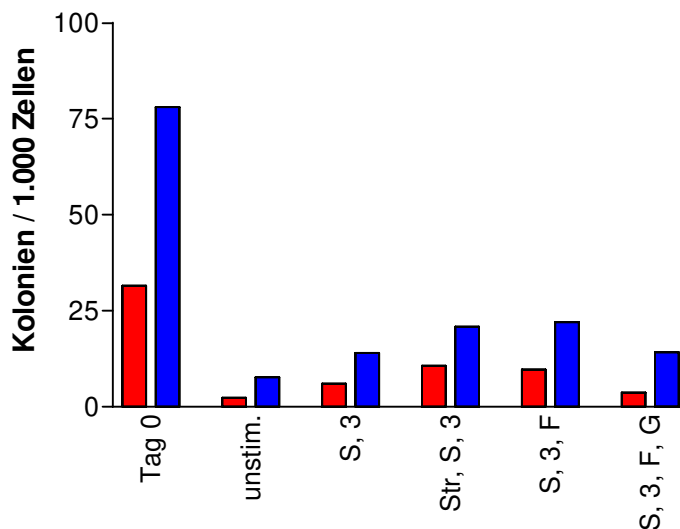
dies der voraussichtliche Zeitraum sein würde, der für eine retrovirale Transduktion, inklusive Separation, Vorstimulation und ggf. Selektion, benötigt würde.

### 3.3.1 Vergleich der Koloniebildungsfähigkeit angereicherter peripherer Stammzellen nach zweitägiger Stimulation

Das Ziel dieser Experimente war es, den Einfluß verschiedener Wachstumsfaktoren, von denen bekannt ist, daß sie einen Einfluß auf Proliferation und Differenzierung haben, zu vergleichen. SCF ist ein essentielles hämatopoetisches Zytokin, das mit anderen Faktoren interagiert und so unabdingbar für die Hämatopoese ist (Hassan and Zander 1996). Auch IL-3 ist ein wichtiger Faktor für den Erhalt und die Differenzierung hämatopoetischer Zellen. In Langzeitkulturen konnte gezeigt werden, daß IL-3 auf die Vermehrung von hämatopoetischen Zellen im allgemeinen und die Zunahme an CFU-GM (Coutinho et al. 1990) und BFU-E (Eliason et al. 1988) im speziellen wirkt. Verschiedene Arbeitsgruppen haben berichtet, daß IL-3 mit IL-6 synergistisch auf die Hämatopoese wirkt, d. h. die Fähigkeiten, Kolonien zu bilden, wird durch das ergänzende Vorhandensein von IL-6 verstärkt (Koller et al. 1992, Leary et al. 1988). Der wohl stärkste Effekt, der auf frühe Vorläuferzellen ausgeübt werden kann, geht sicherlich von der Kokultur mit Stromazellen aus dem Knochenmark aus. Diese Zellen stellen die natürliche Umgebung für hämatopoetische Zellen dar. Es ist leicht vorstellbar, daß durch Zell-Zell-Kontakte und eine Vielzahl von Substanzen, die in die Umgebung abgegeben werden, Signale an die Progenitoren gegeben werden, die für den Erhalt der Hämatopoese wichtig sind. Im Zusammenhang mit retroviralem Gentransfer konnte z. B. nachgewiesen werden, daß durch das Vorhandensein von Stromazellen, bei gleichzeitiger Zytokinstimulation, während der Transduktion die Effizienz des Gentransfers erheblich gesteigert werden kann (Moore et al. 1992, Xu et al. 1995). Vor einigen Jahren wurde der Ligand für den Tyrosin Kinase Rezeptor Flt3 oder Flk-2 kloniert (Lyman et al. 1993). Dieses Protein, das mittlerweile rekombinant in löslicher Form erhältlich ist, hat in Kombination mit anderen Zytokinen und Wachstumsfaktoren eine stark mitogene Wirkung auf alle frühen Vorläuferzellen, ohne diese dabei zur Differenzierung zu bringen, so daß es zu einer Zunahme aller Zelltypen insbesondere der koloniebildenden Zellen kommt (Gabbianelli et al. 1995, McKenna et al. 1995, Ohishi et al. 1996, Rusten et al. 1996, Shah et al. 1996). Die Wirkung, die durch die Inkubation mit Flt3-L erzielt wurde, ist sonst nur durch eine



Kokultivierung mit Knochenmarkstromazellen zu erreichen, was mittlerweile dazu geführt hat, daß Flt3-L weitestgehend die Stroma-Kokultur ersetzt hat. Ein weiterer Faktor, der bereits auf die primitivsten Zellen wirkt, ist GM-CSF (Gasson 1991), das zusammen mit anderen Zytokinen unterstützend auf die Kurz- und Langzeitkultur der myelo-erythroiden Vorläuferzellen wirkt (Hassan and Zander 1996).



**Abbildung 20: Koloniebildung nach zweitägiger Stimulation**

Das Diagramm zeigt einen Vergleich der Koloniebildungsfähigkeit angereicherter CD34<sup>+</sup>-Zellen direkt nach Separation (Tag 0) bzw. nach zweitägiger Inkubation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren. In dem Säulendiagramm sind die gezählten Kolonien (pro  $1 \times 10^4$  ausgesäten Zellen), unterschieden nach CFU-GM (blau) und BFU-E (rot), aufgetragen. Abkürzungen: Str = Stroma, S = SCF, 3 = IL-3, 6 = IL-6, F = Flt3-L, G = GM-CSF.

Für dieses Experiment wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen aus eingefrorenen Leukapharesezellen mit dem CD34-Isolierungskit (Miltenyi) angereichert. Von diesen Zellen wurden  $1 \times 10^4$  in 1 ml Methylcellulosemedium ausgesät. Die übrigen Zellen wurden in Stromamedium mit verschiedenen Zusätzen für zwei Tage inkubiert. In dem ersten Ansatz wurden die Zellen nur mit Stromamedium ohne weitere Stimulantien inkubiert. In den zweiten Ansatz wurden IL-3 (100ng/ml) und SCF (10 ng/ml) als Wachstumsfaktoren zugegeben. Im dritten Ansatz wurden  $3 \times 10^4$  mit 17 Gy bestrahlte Stromazellen in einer Vertiefung einer 96-Loch Platte adhären gelassen. Dann wurden die Zellen in Stromamedium mit IL-3

(100 ng/ml) und SCF (10 ng/ml) ausgesät. Im vierten Ansatz wurden die Zellen mit IL-3 (100 ng/ml), SCF (10 ng/ml) und Flt3-L (100 ng/ml) inkubiert. Im fünften Ansatz wurde zusätzlich noch GM-CSF (100 ng/ml) in das Medium gegeben. Die Zellen wurden zwei Tage inkubiert und jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen in jeweils 1 ml Methylcellulosemedium ausgesät. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Das Ergebnis dieser Auszählung ist in Abbildung 20 dargestellt.

Die Zellen, die direkt nach der Anreicherung im Methylcellulosemedium inkubiert wurden, bildeten 781 BFU-E und 315 CFU-GM. Eine zweitägige Inkubation ohne Wachstumsfaktoren reduzierte die Koloniebildungsfähigkeit um den Faktor zehn. Die zusätzliche Inkubation mit IL-3 und SCF resultierte in einer Verdopplung bis Verdreifachung der Koloniezahl im Vergleich zur zweitägigen Inkubation ohne Wachstumsfaktoren. Im Vergleich der stimulierten Zellen wurde das beste Ergebnis mit der Kombination von Stromazellen, IL-3 und SCF erzielt. Dieses Ergebnis war in etwa vergleichbar mit der Stimulation durch IL-3, SCF und Flt3-L. Interessanterweise resultierte die Zugabe von GM-CSF in einer Reduktion der Koloniezahl um ein Drittel.

### 3.3.2 Vergleichende Analyse der relativen und absoluten Koloniezahlen über verschiedene Zeiträume mit verschiedenen Stimuli

Dieses Experiment unterschied sich von dem vorangegangenen insofern, als daß die Kombination von Zytokinen über einen längeren Zeitraum verfolgt wurde. Über die Ausplattierung einer bestimmten Zahl stimulierter Zellen in Methylcellulosemedium wurde die relative Zahl koloniebildender Zellen bestimmt. Gleichzeitig wurde die jeweilige Zellzahl des Ansatzes bestimmt, so daß sich die absolute Zahl koloniebildender Zellen pro Ansatz hochrechnen ließ.

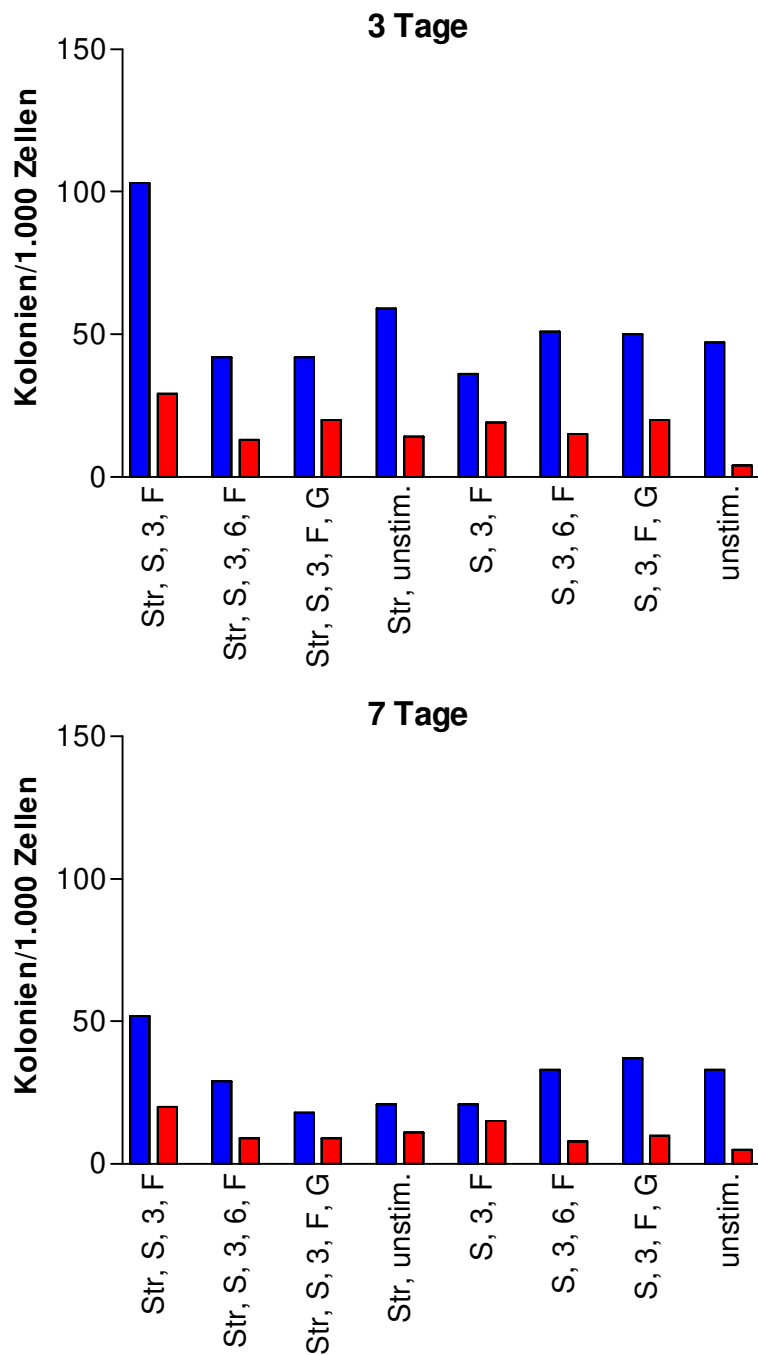
Hierzu wurden mobilisierte Progenitoren aus Leukapharesematerial mit MACS mit einer Reinheit von 98,2 % CD34<sup>+</sup>-Zellen angereichert. Jeweils  $2,6 \times 10^4$  dieser Zellen wurde auf acht verschiedene Ansätze verteilt (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze mit der jeweiligen Zellzahl nach drei und sieben Tagen.**

| Ansatz | Stroma | SCF | IL-3 | IL-6 | Flt3-L | GM-CSF | Tag 3             | Tag 7             |
|--------|--------|-----|------|------|--------|--------|-------------------|-------------------|
| 1      | +      | +   | +    | -    | +      | -      | $2,0 \times 10^4$ | $2,2 \times 10^5$ |
| 2      | +      | +   | +    | +    | +      | -      | $4,6 \times 10^4$ | $3,0 \times 10^5$ |
| 3      | +      | +   | +    | -    | +      | +      | $4,2 \times 10^4$ | $5,2 \times 10^5$ |
| 4      | +      | -   | -    | -    | -      | -      | $9,0 \times 10^3$ | $4,0 \times 10^4$ |
| 5      | -      | -   | +    | -    | +      | -      | $3,6 \times 10^4$ | $2,4 \times 10^5$ |
| 6      | -      | +   | +    | +    | +      | -      | $3,8 \times 10^4$ | $3,6 \times 10^5$ |
| 7      | -      | +   | +    | -    | +      | +      | $2,0 \times 10^4$ | $3,2 \times 10^5$ |
| 8      | -      | +   | -    | -    | -      | -      | $2,0 \times 10^3$ | $4,0 \times 10^3$ |

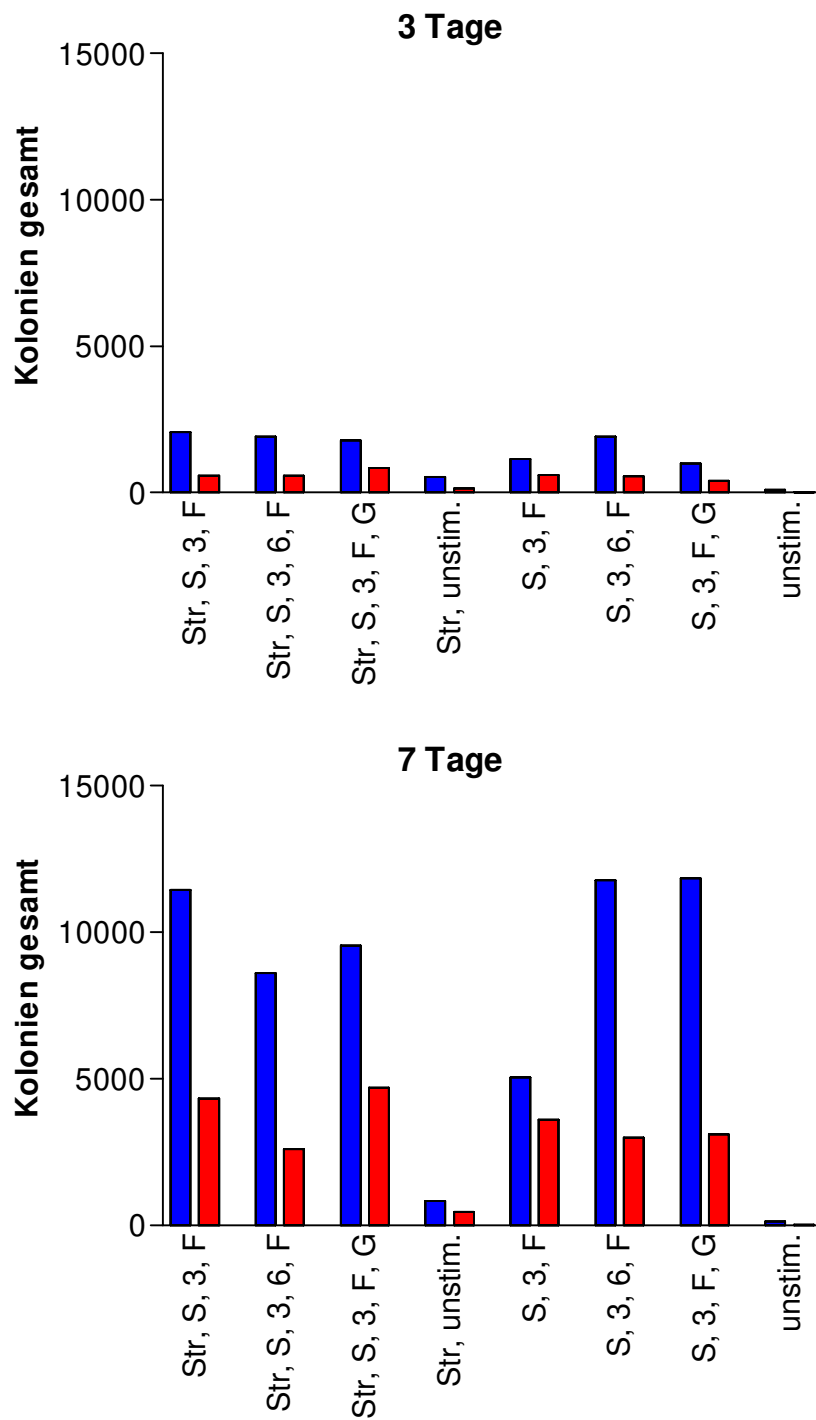
Die Konzentration der verschiedenen Zytokine betrug wie in den vorher beschriebenen Experimenten 10 ng/ml SCF, 100 ng/ml für die anderen Wachstumsfaktoren. Wurden die Zellen mit Stromazellen kokultiviert, so wurden die Stromazellen nach sechswöchiger Kulturzeit mit 17 Gy bestrahlt und jeweils  $4 \times 10^3$  pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte ausgesät. Nachdem die Stromazellen adhäriert waren, wurden 200 µl Stromamedium mit CD34<sup>+</sup>-Zellen (Titer von  $1,3 \times 10^5$ ), mit oder ohne Wachstumsfaktoren, in jede Vertiefung gegeben. Nach drei und sieben Tagen wurden die Zellen, die sich leicht suspendieren ließen, gezählt und jeweils 3.000 von ihnen in Methylcellulosemedium ausplattiert. Die verbliebenen Zellen wurden am siebten Tag zusätzlich mit einem CD34 mAk markiert. Der Prozentsatz CD34<sup>+</sup>-Zellen wurde durchflußzytometrisch bestimmt. Durch Multiplikation mit der Gesamtzellzahl ließ sich die Anzahl CD34<sup>+</sup>-Zellen pro Ansatz berechnen.

Die Auszählungen der Kolonien sind in Abbildung 21, die berechnete Anzahl koloniebildender Zellen in Abbildung 22 und die Auswertung der Zahl CD34<sup>+</sup>-Zellen in Abbildung 23 dargestellt.



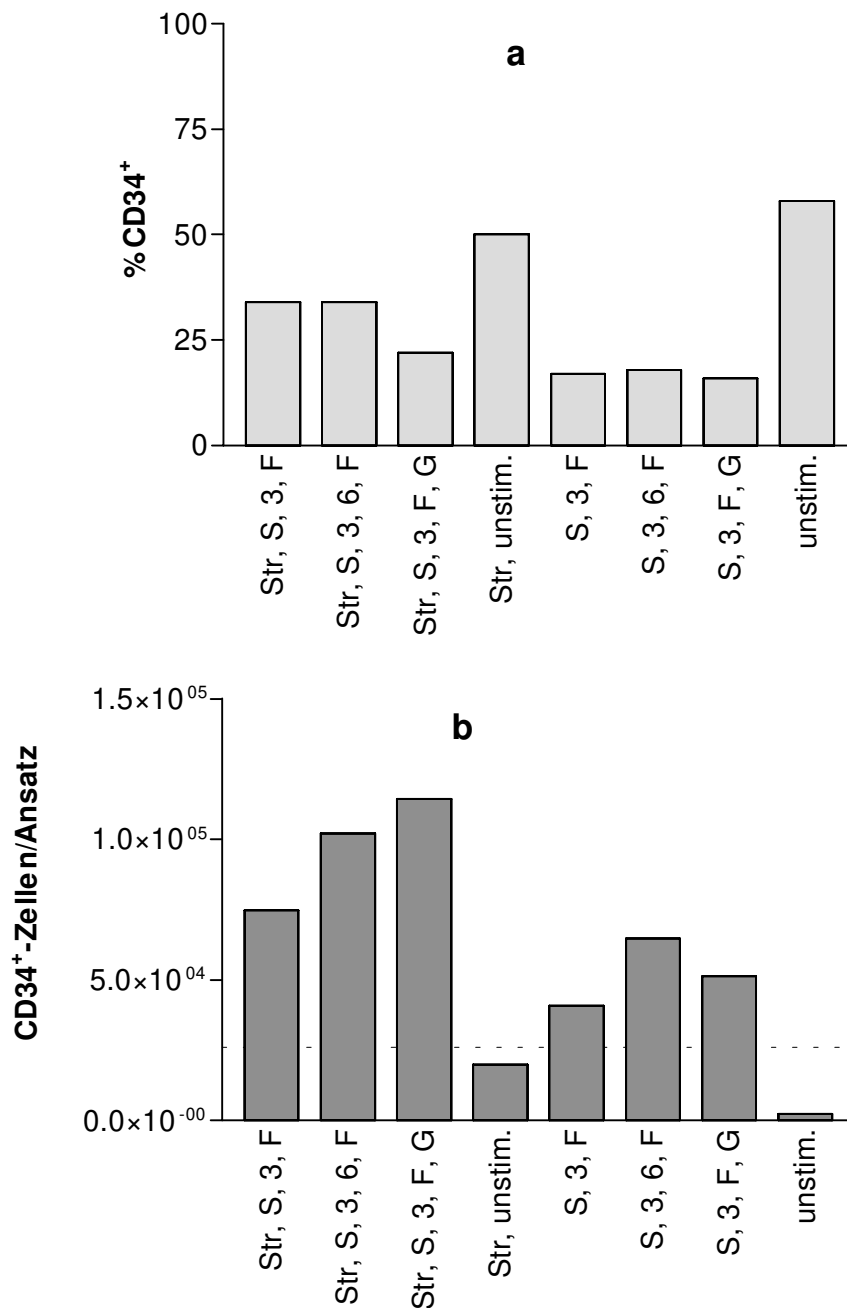
**Abbildung 21: Relative Anzahl koloniebildender Zellen**

Nach drei und sieben Tagen Stimulation mit verschiedenen Zytokinkombination bzw. mit Kokultivierung bestrahlter Knochenmarkstromazellen wurden die Koloniezahlen pro 1.000 ausgesäten Zellen bestimmt. Je Ansatz wurden 3.000 Zellen in 1 ml Methylcellulosemedium ausgesät und die BFU-E (rot) und CFU-GM (blau) nach 14 Tagen gezählt. Abkürzungen: Str = Stroma, S = SCF, 3 = IL-3, 6 = IL-6, G = GM-CSF.



**Abbildung 22: Absolute Anzahl koloniebildender Zellen pro Ansatz**

Die in den Diagrammen dargestellten Werte wurden aus der in Tabelle 3 aufgelisteten Zellzahlen und der in Abbildung 21 gezeigten Koloniezahlen extrapoliert. Die BFU-E sind rot und die CFU-GM blau dargestellt. Abkürzungen: Str = Stroma, S = SCF, 3 = IL-3, 6 = IL-6, F = Flt3-L, G = GM-CSF.



**Abbildung 23: CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen**

Bestimmung der Zahl CD34<sup>+</sup>-Zellen nach sieben Tagen Stimulation mit verschiedenen Zytokinkombinationen bzw. mit Kokultivierung bestrahlter Knochenmarkstromazellen. Durch Markierung der Zellen und anschließender FACS-Analyse wurde der Prozentsatz CD34<sup>+</sup>-Zellen bestimmt (a). Durch Multiplikation mit den jeweiligen Gesamtzellzahlen ließ sich die Zahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen pro Ansatz berechnen (b). Die Linie zeigt die absolute Zahl CD34<sup>+</sup>-Zellen am Tag 0. Abkürzungen: Str = Stroma, S = SCF, 3 = IL-3, 6 = IL-6, F = Flt3-L, G = GM-CSF.

Die in Abbildung 21 grafisch dargestellte Auszählung der Kolonietypen nach drei- bzw. nach siebentägiger Kultur zeigt in erster Line, daß die relative Koloniebildungsfähigkeit sowohl der BFU-E als auch der CFU-GM in allen acht Ansätzen mit der Zeit der Stimulation zurückging. Der Vergleich der verschiedenen Stimulationen an den jeweiligen Tagen zeigte, daß die Koloniebildungsfähigkeit für beide Kolonietypen weitestgehend unabhängig von der Zusammensetzung der Stimulationsansätze war. Lediglich die Kombination von Stroma mit SCF, IL-3 und Flt3-L zeigte nach drei Tagen stark erhöhte Werte für CFU-GM und leicht erhöhte Werte für BFU-E, während der gänzlich unstimulierte Ansatz eine normale Zahl von CFU-GM zeigte, aber eine stark reduzierte Zahl von BFU-E. Diese Tendenzen waren nach sieben Tagen immer noch erkennbar, wenn auch nicht so deutlich. Ein Vergleich der jeweiligen Ansätze mit oder ohne Stroma nach sieben Tagen ergab, daß eine Stromakokultur die Erythropoese leicht favorisierte, während die stromafreien Ansätze etwas mehr myeloide Kolonien hervorbrachten.

Bei der Betrachtung der in Tabelle 3 aufgelisteten Zellzahlen ist zu erkennen, daß die Zellzahlen nach drei Tagen in den Ansätzen ohne Zytokine deutlich niedriger waren als die Ausgangszellzahl. Die Zellzahlen der Ansätze eins und sieben nahmen leicht ab, während bei allen anderen Ansätzen eine deutliche Zunahme der Zellzahlen zu verzeichnen war. Nach sieben Tagen lag der Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne Zytokine bereits bei einer Zehnerpotenz bei dem Ansatz mit Stromakokultur und bei zwei Zehnerpotenzen bei dem Ansatz ohne Zytokine und ohne Stroma. Die Ansätze, die mit SCF, IL-3 und Flt3-L inkubiert wurden, zeigten eine knappe Verzehnfachung der Ausgangszellzahl, unabhängig davon, ob diese mit Stromazellen kokultiviert wurden. Die anderen Zytokin-stimulierten Ansätze ergaben mehr als eine Verzehnfachung der Zellzahl. Bei dem stromahaltigen Ansatz mit SCF, IL-3 und GM-CSF war sogar eine Zunahme der Ausgangszellzahl um den Faktor 20 zu beobachten.

In Abbildung 22 wurde die berechnete Zahl der koloniebildenden Zellen nach BFU-E und CFU-GM unterschieden. Werden die Ansätze ohne Zytokine außer acht gelassen, so zeigten die absoluten Koloniezahlen nach drei Tagen noch keine großen Unterschiede. Auch nach sieben Tagen zeigten sich zwischen den verschiedenen Zytokin-stimulierten Ansätzen keine großen Unterschiede bei den BFU-E. Bei den CFU-GM schien SCF, IL-3 und Flt3-L alleine nicht auszureichen, um eine optimale Stimulation dieser Differenzierungslinie zu erzielen. War dagegen ein zusätzlicher Stimulus entweder in Form von Stromazellen oder durch die Präsenz von IL-6 oder GM-CSF im Medium vorhanden, kam

es zu einer Verdopplung der CFU-GM. Die Ansätze, die IL-6- oder GM-CSF-stimuliert waren, erbrachten keine weiteren positiven Effekte durch die Stromakokultur. Es sah sogar eher so aus, als ob die Stromazellen eine leichte Reduktion der CFU-GM bewirkten.

Ein deutlicher Effekt der Kokultur mit Knochenmarkstromazellen trat nach Betrachtung der CD34-Expression auf den Zellen zutage. In Abbildung 23 (a) ist deutlich zu erkennen, daß die Zellen, die auf den Stromazellen kultiviert wurden, einen wesentlich höheren Anteil CD34<sup>+</sup>-Zellen haben als ihre stromafreien Pendanten. Hiervon ausgenommen waren die zytokinfreien Ansätze, die eher eine umgekehrte Relation zeigten. Dies ließ sich wahrscheinlich darauf zurückführen, daß durch die fehlende Stimulation keine Zellteilung und daher auch kein "Verdünnen" des CD34-Antigens stattfand. Genausowenig wurden irgendwelche zytokinvermittelten Differenzierungsprozesse in die Wege geleitet, die zu einer Änderung des Antigenrepertoires führten. Die Berechnung der absoluten CD34<sup>+</sup>-Zellzahlen ergab, wie in Abbildung 23 (b) zu sehen ist, eine Zunahme der initialen Zahl CD34-positiver Zellen bis auf das Fünffache im Fall der Kultivierung mit Stromazellen, SCF, IL-3, Flt3-L und GM-CSF. Bei den stromafreien Ansätzen war, in Gegenwart von SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L, konnte eine Vermehrung der CD34<sup>+</sup>-Zellen bis auf das 2,5fache erreicht werden.

Die Kokultivierung von angereicherten hämatopoetischen Vorläuferzellen des peripheren Blutes mit Knochenmarkstromazellen zeigte bereits nach einwöchiger Inkubation eine starke Wirkung auf die Zahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen. Auch bei den koloniebildenden Zellen war ein moderater positiver Effekt der Stromazellen auf die Erythropoese zu verzeichnen, während die Zellen der myeloiden Reihe ohne den Einfluß des Stromas offensichtlich besser proliferierten. Eine quantitative Analyse von Zellen in Kokultur mit Stromazellen wurde erschwert, weil sich Zellen zwischen den Stromazellen eingenistet haben und es so sehr schwierig war, die gesamte Population der stimulierten Zellen zu analysieren, ohne eine massive Kontamination durch Stromazellen zu haben. Aber auch wenn versucht wurde, die hämatopoetischen Zellen vorsichtig von den Stromazellen abzuspülen, konnte eine Kontamination durch Stromazellen nicht vollständig verhindert werden. Wurden diese dann in einem *colony-formation-assay* ausplattiert, so war die Auswertung erschwert und die Ergebnisse waren möglicherweise verfälscht. Es konnte gezeigt werden, daß Flt3-L als Wachstumsfaktor Stimulationssignale, die normalerweise von Stromazellen ausgehen, ersetzen oder kompensieren kann. Das Zusammenwirken



von beiden hatte keine weiteren Einflüsse auf die Zahl koloniebildender Zellen. Aus diesen Gründen wurde ab diesem Zeitpunkt auf die Stromakokultur verzichtet. Die Kombination, die bei allen Experimenten die besten Ergebnisse brachte, war die Stimulation mit SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L. In den *Colony-formation-assays* zeigte die Verwendung von GM-CSF anstelle des IL-6 die gleichen Resultate. Die Analyse der CD34<sup>+</sup>-Zellen zeigte aber, daß IL-6 einen stärkeren Einfluß auf die Zunahme CD34<sup>+</sup>-Zellen hat.

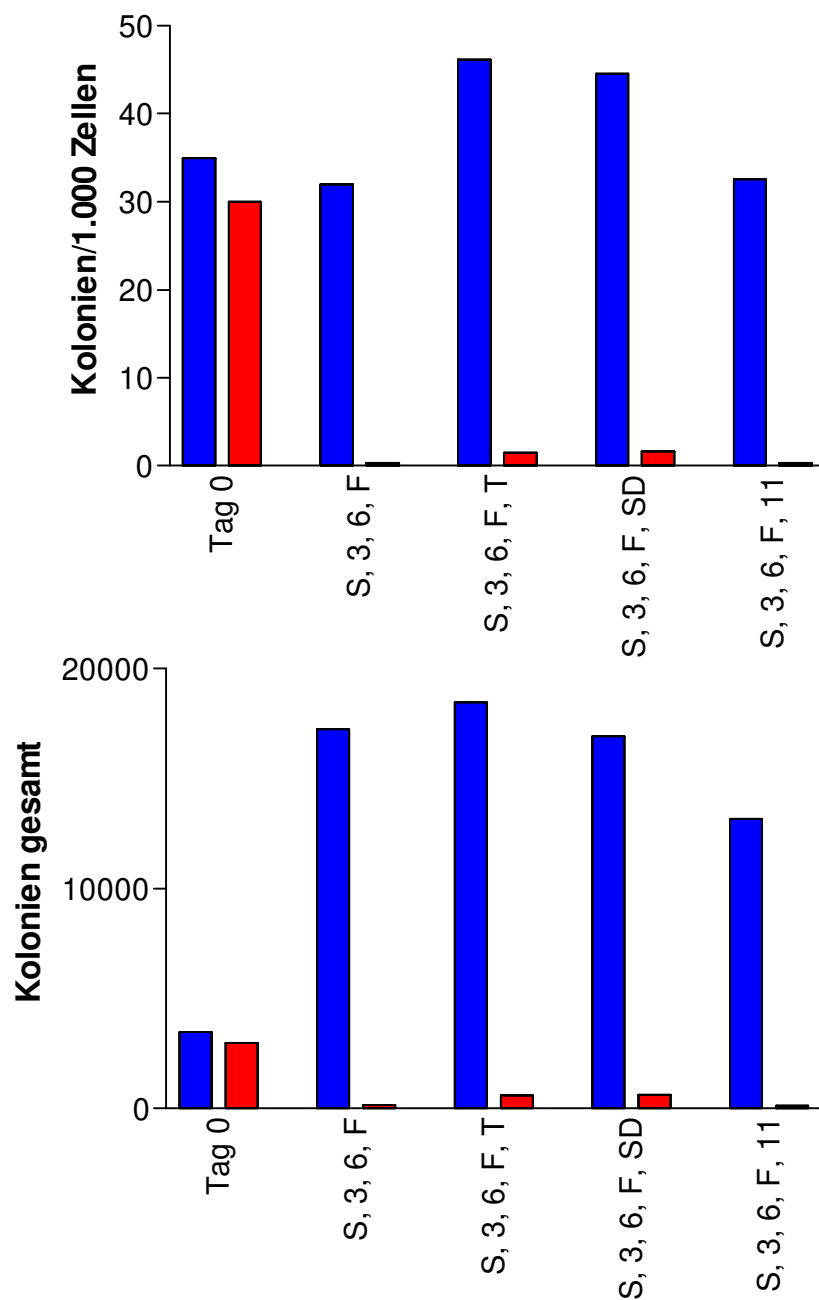
### 3.3.3 Untersuchung des Einflusses von Thrombopoetin, SDF-1 und IL-11 auf die Kultivierung hämatopoetischer Progenitoren

Es gibt neben den bisher getesteten Zytokinen noch eine Vielzahl weiterer Faktoren, die das Wachstum und die Differenzierung hämatopoetischer Zellen beeinflussen, wie z. B. Thrombopoetin, welches das Wachstum einiger hämatopoetischer Linien sowie der CD34<sup>+</sup>-Zellen fördern kann (Young et al. 1996). Ein anderer Effekt des Thrombopoetins besteht darin, positiv auf die Überlebensfähigkeit, insbesondere die der sehr primitiven Zellen, wirken zu können und hämatopoetische Zellen vor Apoptose zu schützen (Borge et al. 1997). Ein anderer Faktor, das Chemokin SDF-1 (*stromal derived-factor-1*), hat bisher keine nachgewiesene Wirkung auf die Proliferation hämatopoetischer Zellen. SDF-1 ist aber ein Signalstoff, der wichtig für das *homing* hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen und somit ein Bestandteil der natürlichen Umgebung dieser Zellen ist (Kim and Broxmeyer 1998). Ob SDF-1 einen Einfluß auf das Wachstum von hämatopoetischen koloniebildenden Zellen hat, sollte hier überprüft werden. Interleukin-11 ist ein weiteres Zytokin, das das Wachstum koloniebildender Zellen im Zusammenspiel mit anderen Faktoren wie z. B. IL-3 stimulieren kann (Du and Williams 1994). In diesem Versuch sollte geklärt werden, ob das zusätzliche Vorhandensein einer der genannten Faktoren zu der Standard-Faktorkombination SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L weitere Effekte auf das Wachstum koloniebildender Zellen oder CD34<sup>+</sup>-Zellen hatte.

CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden aus Knochenmarks mit dem MACS 'CD34 Multisort Kit' mit einer Reinheit von 98 % angereichert. Von den so erhaltenen CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden 3.300 in 1 ml Methylcellulosemedium (CellSystems) in doppelten Ansätzen ausplattiert. Die entstandenen Kolonien wurden nach 14 Tagen ausgezählt. Die übrigen Zellen wurden

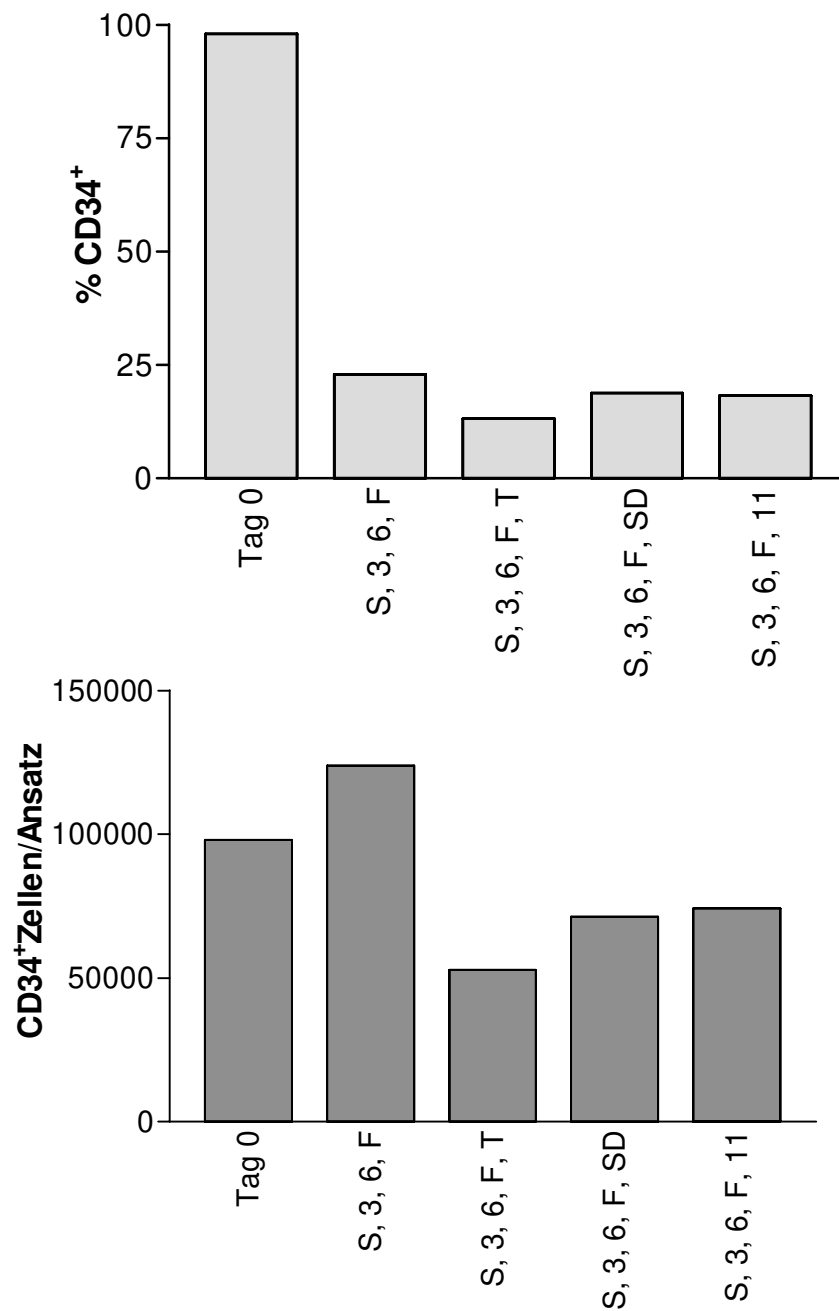
mit einem Titer von  $1 \times 10^5$  in vier Ansätzen für die Dauer von fünf Tagen inkubiert. Für den ersten Ansatz wurde Stromamedium mit SCF (10ng/ml), IL-3 (100 ng/ml), IL-6 (100 ng/ml) und Flt3-L (100 ng/ml) verwendet. Die Ansätze zwei bis vier hatten als Basis die gleiche Zusammensetzung wie der erste Ansatz, nur daß im zweiten Ansatz noch Tpo (50 ng/ml), im dritten SDF1 (100 ng/ml) und im vierten IL-11 (100 ng/ml) zugesetzt wurden. Nach den fünf Tagen wurden die jeweiligen Titer bestimmt, 3.300 Zellen in doppelten Ansätzen in Methylcellulosemedium ausgesät und vom Rest im FACS der Anteil CD34<sup>+</sup>-Zellen bestimmt. Nach 14tägiger Inkubation der Zellen im Methylcellulosemedium wurden die Kolonien gezählt. Die absoluten Zahlen koloniebildender Zellen und die absoluten Zahlen CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden aus den Zelltitern und den Kolonieauszählungen bzw. FACS-Messungen bestimmt. Die Ergebnisse der Colony-formation-assays sind in Abbildung 24, die Resultate der FACS-Messungen in Abbildung 25 dargestellt.

Die Abbildung 24 zeigt, daß die relativen Zahlen der erythroiden Kolonien nach fünftägiger Stimulation mit verschiedenen Kombinationen von Wachstumsfaktoren sehr stark zurückgegangen waren. Die relativen Zahlen der myeloiden Kolonien blieben, im Fall der Stimulation mit SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L bzw. der zusätzlichen Inkubation mit IL-11, konstant. Eine Zunahme der relativen Koloniezahlen für diese Kolonietypen um ca. 20 % war in den Ansätzen zu beobachten, welche neben dem Standard-Zytokincocktail noch mit Tpo oder SDF-1 inkubiert wurden. Die Betrachtung der absoluten Koloniezahlen (Abbildung 24, unten), ergab, daß die Zahl der BFU-E nach wie vor deutlich unter dem Ausgangswert lag, während die Zahl myeloider Kolonien die Zahl der ursprünglich vorhandenen um ein Vielfaches überstieg. Bei dem Vergleich der verschiedenen Stimulationsansätze untereinander zeigten die ersten drei Ansätze die gleiche Zahl CFU-GM. Der Ansatz, der mit IL-11 stimuliert wurde, zeigte, bezogen auf die CFU-GM, in diesem Vergleich eine reduzierte Koloniezahl. Bei der Betrachtung der BFU-E fiel es schwer, die verschiedenen Ansätze zu vergleichen, da die Zahl der ausgezählten erythroiden Kolonien in allen Ansätzen sehr gering war.



**Abbildung 24: Relative und absolute Zahlen koloniebildender Zellen**

Die Kolonien wurden unterschieden nach CFU-GM (blau) und BFU-E (rot). Das obere Diagramm gibt die Zahl koloniebildender Zellen pro 1.000 Zellen an. Die Angaben aus dem unteren Diagramm wurden aus den Koloniezahlen pro 1.000 und den jeweiligen Titern berechnet. Abkürzungen: S = SCF, 3 = IL-3, 6 = IL-6, F = Flt3-L, T = Tpo, SD = SDF-1, 11 = IL-11.



**Abbildung 25: Bestimmung der Zahl CD34<sup>+</sup>-Zellen**

Nach fünf Tagen Stimulation mit verschiedenen Zytokinkombinationen wurden die Zellen mit einem CD34 mAk markiert und anschließend im FACS der Prozentsatz CD34<sup>+</sup>-Zellen bestimmt. Durch Multiplikation mit den jeweiligen Gesamtzellzahlen ließ sich die Zahl der CD34<sup>+</sup>-Zellen pro Ansatz berechnen. Abkürzungen: S = SCF, 3 = IL-3, 6 = IL-6, F = Flt3-L, T = Tpo, SD = SDF-1, 11 = IL-11.

Die Auswertung der Anteile der CD34<sup>+</sup>-Zellen zeigte erwartungsgemäß einen Rückgang während der Kulturdauer auf etwa 20 - 25 % des Ausgangswertes. Die höchsten Prozentwerte von CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden in dem Ansatz, der mit dem Standard-Zytokincocktail inkubiert wurde, erzielt, die schlechtesten im Tpo-Ansatz, und die Ansätze mit SDF-1 und IL-11 lagen dazwischen. Noch deutlicher wurde dieses Ergebnis nach der Hochrechnung der Gesamtzahlen CD34<sup>+</sup>-Zellen. Der Ansatz mit SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L lag hier sogar um 25 % über der Zahl ursprünglich eingesetzter Zellen. Der Tpo-Ansatz zeigte in dieser Beziehung eine Reduktion um fast 50 %, die SDF-1 und IL-11 Ansätze eine Reduktion um ca. 20 %.

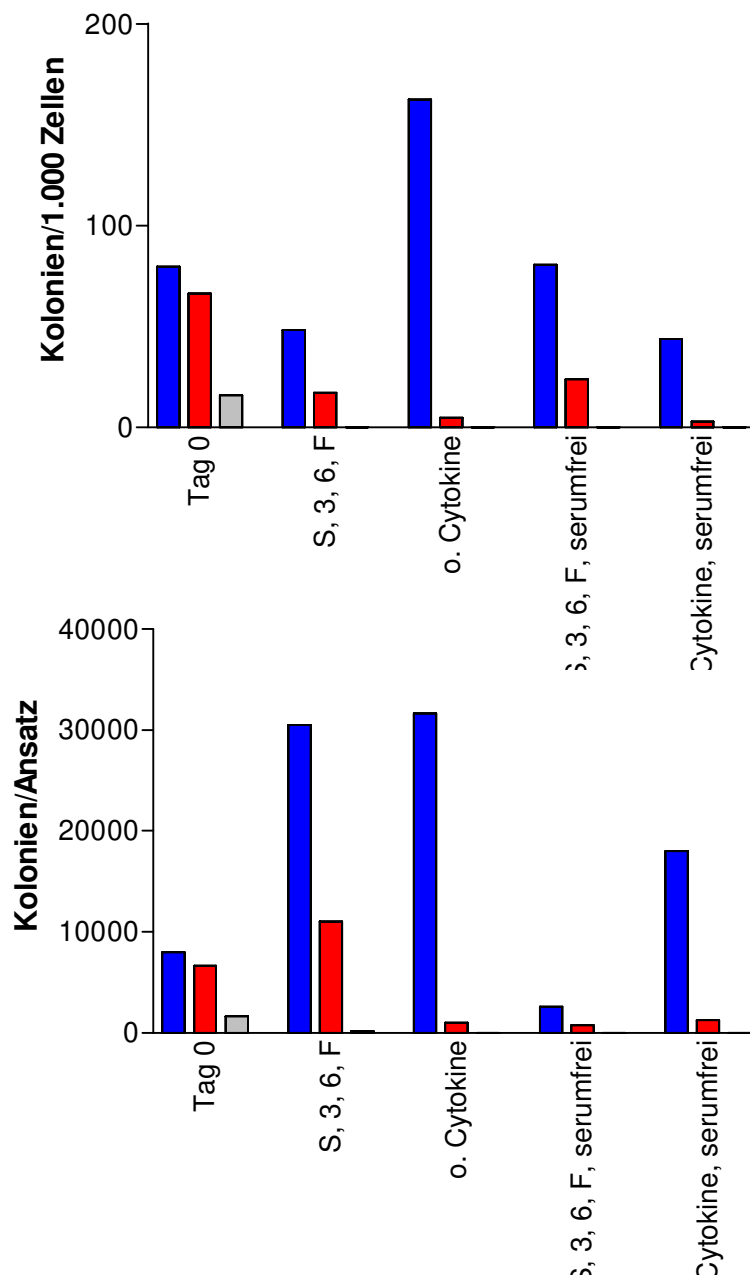
Dieses Experiment zeigte, daß eine Stimulation hämatopoetischer Zellen mit dem Standard-Zytokincocktail (SCF, IL-3, IL-6 und FLT3-L), wie auch schon in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, zu einer Vermehrung koloniebildender Zellen führte. Eine zusätzliche Inkubation mit Tpo, SDF-1 oder IL-11 hatte keine weiteren positiven Auswirkungen auf die Zahl und die Zusammensetzung der Kolonien. Im Fall des IL-11 wurde die Stimulation sogar leicht gehemmt. Die FACS-Messungen der CD34<sup>+</sup>-Zellen ergab nur für die sog. Standardkombination eine Zunahme der CD34<sup>+</sup>-Zellzahl. Zusammenfassend läßt sich daraus schließen, daß eine zusätzliche Stimulation der CD34<sup>+</sup>-Zellen mit Tpo, SDF-1 oder IL-11 keine weiteren positiven Effekte zeigt, so weit sie sich mit diesem System messen lassen. Aus diesem Grund wurden diese Faktoren in weiteren Experimenten nicht mehr verwendet.

### 3.3.4 Stimulation von angereicherten hämatopoetischen Progenitoren eines PNH-Patienten

Bei der PNH als schwere hämatologische Erkrankung kommt es oft zu schwerwiegenden Störungen der Hämatopoese im Knochenmark. Daher ändert sich die Zusammensetzung des Knochenmarks mit dem Fortschreiten der Erkrankung. Es wurde des weiteren berichtet, daß die Koloniebildungsfähigkeit der Progenitoren von PNH-Patienten unter der von gesunden Kontrollen liegt. Aus diesem Grund war es nicht als selbstverständlich anzusehen, daß sich die Erkenntnisse, die aus Stimulationsexperimenten mit mobilisierten oder Knochenmarkprogenitoren von Normalspendern gewonnen wurden, so auf die Kultur hämatopoetischer Vorläuferzellen von PNH-Patienten übertragen ließen. Daher mußte

zumindest für einen PNH-Patienten exemplarisch gezeigt werden, daß sich auch diese Zellen *in vitro* zur Teilung anregen lassen und dabei ihre Koloniebildungsfähigkeit beibehalten. Ein weiterer Aspekt, der in diesem Versuch von Interesse war, war die Frage, ob hämatopoetische Progenitoren von PNH-Patienten auch in serumfreiem Medium kultiviert und stimuliert werden können. Wäre dies möglich, so könnten einige Bedingungen besser standardisiert werden. Im Serum gibt es immer ein vielfältiges Gemisch verschiedener Faktoren, die nicht charakterisiert sind und möglicherweise auch Einfluß auf die Kultivierung hämatopoetischer Zellen nehmen können.

Knochenmarkprogenitorzellen eines PNH-Patienten wurden mit dem MACS 'CD34 Multi-sort Kit' angereichert. Ein Teil der Zellen wurde direkt in Methylcellulosemedium (CellSystems) ausplattiert und 14 Tage inkubiert. Die anderen Zellen wurden auf vier Stimulationsansätze mit einem Titer von  $1 \times 10^5$  verteilt. Der erste Ansatz bestand aus Stromamedium, dem SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L zugesetzt wurden. Die Zellen des zweiten Ansatzes wurden in Stromamedium ohne Wachstumsfaktoren inkubiert. Die Zellen des dritten und vierten Ansatzes wurden in serumfreiem Medium (Cellgro-Medium, Cellgenix) inkubiert, wobei dem dritten Ansatz noch SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L zugesetzt wurden. Die Konzentration der Zytokine betrug, wie auch schon in den vorangegangenen Ansätzen, 10 ng/ml für SCF und 100 ng/ml für die anderen Faktoren. Nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen wurden die Titer der verschiedenen Ansätze bestimmt und Aliquots der Zellen in Methylcellulosemedium ausplattiert. Nach 14tägiger Inkubation wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt. Die Ergebnisse der Auszählungen bzw. die errechneten absoluten Zahlen koloniebildender Zellen sind in den Diagrammen in Abbildung 26 dargestellt.



**Abbildung 26: Stimulation von CD34<sup>+</sup>-Zellen eines PNH-Patienten**

In den Diagrammen sind die relativen und absoluten Zahlen koloniebildender Zellen nach Stimulation hämatopoetischer Progenitoren eines PNH-Patienten in den verschiedenen Stimulationsansätzen bzw. direkt nach Separation. Die Kolonien wurden unterschieden nach CFU-GM (blau), BFU-E (rot) und CFU-Mix (grau). Das obere Diagramm gibt die Zahl koloniebildender Zellen pro 1.000 Zellen an. Die Angaben aus dem unteren Diagramm wurden aus den Koloniezahlen pro 1.000 Zellen und den jeweiligen Titern berechnet. Abkürzungen: S = SCF, 3 = IL-3, 6 = IL-6, F = Flt3-L.

Die Auszählung der relativen Koloniezahlen ergab für den Ansatz mit Stromamedium und dem Standard-Zytokincocktail ein Ergebnis, das vergleichbar mit den Ergebnissen aus Stimulationsexperimenten mit Zellen von Normalspendern war. D. h., die relative Koloniebildungsfähigkeit der Zellen geht mit fortschreitender Kulturzeit zurück. Dies traf in besonderem Maße auf die Zahl der BFU-E und CFU-Mix und weniger auf die CFU-GM zu. Überraschenderweise betrug die relative Zahl der CFU-GM in dem Ansatz mit Stromamedium aber ohne Zytokine in etwa das Doppelte des Ausgangswertes, die Zahl der BFU-E war aber noch deutlich unter der Koloniezahl des Ansatzes mit Wachstumsfaktoren. Der Ansatz mit serumfreiem Medium und Zytokinen zeigte einen Anteil von CFU-GM, der vergleichbar mit der unstimulierten Kontrolle war. Die Zahl der BFU-E war im Vergleich zum Kontrollansatz zwar reduziert, aber deutlich höher als im Fall der Stimulation mit Stromamedium und Zytokinen. Der serumfreie Ansatz ohne Wachstumsfaktoren zeigt für alle Kolonietypen die schlechtesten Resultate. Der einzige Ansatz, bei dem nach Stimulation noch CFU-Mix nachweisbar waren, war die Kultur mit Stromamedium und Wachstumsfaktoren. Die Hochrechnung der absoluten Koloniezahlen zeigte für diesen Ansatz ein noch besseres Bild. Dieser Ansatz war der einzige, bei dem es zu einer Vermehrung von BFU-E und CFU-GM kam. Zwar zeigten die beiden Ansätze ohne Wachstumsfaktoren eine Erhöhung der CFU-GM-Zahlen, aber eine sehr starke Reduktion bei den erythroiden Kolonietypen.

Dieses Experiment hat gezeigt, daß der Stimulationansatz mit Stromamedium, SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L für die Stimulation von angereicherten CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von PNH-Patienten ebenso geeignet ist wie für die Stimulation hämatopoetischer Zellen aus normalem Knochenmark. Wollte man serumfreies Medium verwenden, müßten die Zellkulturbedingungen gesondert angepaßt werden. Mit der getesteten Kombination von Wachstumsfaktoren war mit dem serumfreien Medium keine befriedigende Stimulation der Zellen zu erzielen, so daß auch für die *in vitro* Kultur von Zellen von PNH-Patienten der schon zuvor als Standard festgelegte Cocktail als beste Lösung erscheint.



### 3.4 Retrovirale Transduktion

Nachdem die Kulturbedingungen etabliert waren, wurden die klonierten Vektoren zur Produktion rekombinanter Retroviren und somit zur Infektion von Zielzellen eingesetzt. In der ersten Phase dieser Versuchsreihe wurden die Produzentenzellen generiert und die Titer der Überstände bestimmt. Anschließend wurden die GPI-defizienten Jurkat-Zellen infiziert, um zu überprüfen, ob durch die Transduktion eine stabile Expression des *PIG-A* Gens stattfand und somit durch Komplementation der GPI-Defekt aufgehoben wurde.

Der nächste Schritt bestand darin, CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen zu infizieren, die mit den ausgetesteten Bedingungen stimuliert wurden. Über eine Auszählung von antibiotikums-resistenten Kolonien in einem *colony-formation-assay* wurde dann die Effizienz der Transduktion ermittelt. An diesem System wurden dann verschiedene Infektionsverfahren überprüft, um die beste Methode zu ermitteln.

Die eigentlichen Zielzellen des retroviralen *PIG-A* Gentransfers, die GPI-defizienten Progenitorzellen von PNH-Patienten, sollten dann unter Anwendung aller in vorangegangenen Experimenten gewonnenen Erkenntnisse unter optimierten Bedingungen infiziert werden. Danach sollten die Zellen dann GPI-verankerte Oberflächenmoleküle auf der Zellmembran tragen.

#### 3.4.1 Herstellung von Produzentenzellen

Die retroviralen Produzentenzellen wurden generell in einem zweistufigen Verfahren hergestellt, obwohl auch berichtet wurde, daß sehr hohe Virustiter durch transiente Transfektion erzielt wurden (Pear et al. 1993). Als erstes wurde die ecotrope Verpackungslinie GP+E86 mit dem Vektorplasmid transfiziert. Nach einer gewissen Selektionszeit mit einem geeigneten Antibiotikum bildeten sich resistente Kolonien. Diese wurden expandiert, und die virushaltigen Überstände wurden dann verwendet, um amphotrope PA317 oder GP+envAm12 bzw. pseudotypisierte PG13 Zellen zu infizieren. Wurde diese Infektion in einer Verdünnungsreihe gemacht, war es möglich, nach ca. zwei Wochen Selektion antibiotikaresistente Einzelkolonien zu isolieren und diese zu expandieren. Die Virustiter der Überstände dieser Einzelklone wurden dann bestimmt und verglichen, um

so Klone mit höchsten Virustitern zu identifizieren. Bei allen verwendeten Verpackungszellen wurden Virustiter von max.  $1 - 2 \times 10^5$  cfu/ml erzielt. Einige Klone mit niedrigeren Titern wurden nicht mehr für weitere Experimente verwendet.

Auf diese Weise wurden mehrere Produzentenlinien generiert, die in Tabelle 4 dargestellt sind. Die Vektoren, die das MDR1-Gen als selektionierbaren Marker trugen, wurden ebenfalls in die GP+E86-Zellen transfiziert. Aus diesen Kolonien bildeten sich unter Selektion mit 20 - 30 ng/ml Colchicin (Sigma, #C9754) Kolonien. Diese wurden genauso wie die anderen Produzentenlinien expandiert. Mit Überständen dieser Zellen wurden auch PG13-Zellen in Verdünnungsreihen infiziert. Dabei fiel auf, daß sich bei allen Verdünnungsstufen einzelne Kolonien bildeten, die sich ebenfalls expandieren ließen. Ein Virustiter-Assay ergab allerdings, daß sich im Überstand keine Viruspartikel befanden, die in der Lage waren, Kolonien unter Colchicinselektion zu bilden. Anschließende FACS-Analysen mit anti-p-Glycoprotein mAk zeigten weder für die transfizierten GP+E86 noch für die transduzierten PG13-Zellen eine Expression von p-Glycoprotein. Ein ebenfalls durchgeführter Rhodamin 123 *exclusion-assay* zeigte auch keine Ausschleusung des Rhodamins in allen untersuchten Zellen. Offensichtlich zeigten die Zellen keine ausreichende Expression des *MDR1*-Gens. Die beobachtete Bildung resistenter Kolonien kann wahrscheinlich auf endogene Resistenzmechanismen zurückgeführt werden. Deshalb wurde in allen nachfolgenden Versuchen nur Produzentenlinien verwendet, die Vektoren mit dem Neo-Resistenzgen produzierten.

**Tabelle 4: Retrovirale Produzentenlinien**

| Produzentenlinie | Vektorplasmid | Verpackungszelle | Titer [cfu/ml]  |
|------------------|---------------|------------------|-----------------|
| PG13LXSN         | pLXSN         | PG13             | $1 \times 10^5$ |
| PG13LPSN         | pL-PIGA-SN    | PG13             | $1 \times 10^5$ |
| PA317LPSN        | pL-PIGA-SN    | PA317            | $1 \times 10^5$ |
| GP+envAm12LPSN   | pL-PIGA-SN    | GP+envAm12       | $1 \times 10^5$ |
| PG13SNIP         | pSNIP         | PG13             | $2 \times 10^5$ |
| PG13PP           | pLPIN         | PG13             | $5 \times 10^4$ |

Die Tabelle zeigt die in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten stabilen retroviralen Produzentenlinien (erste Spalte). Die beiden nächsten Spalten geben an, auf welchem Plasmid und auf welcher Verpackungslinie diese Zellen beruhen. Die letzte Spalte gibt die Titer der klonierten Verpackungszellen an.

### 3.4.2 Stabile Transduktion der GPI-defizienten Jurkat-Zellen

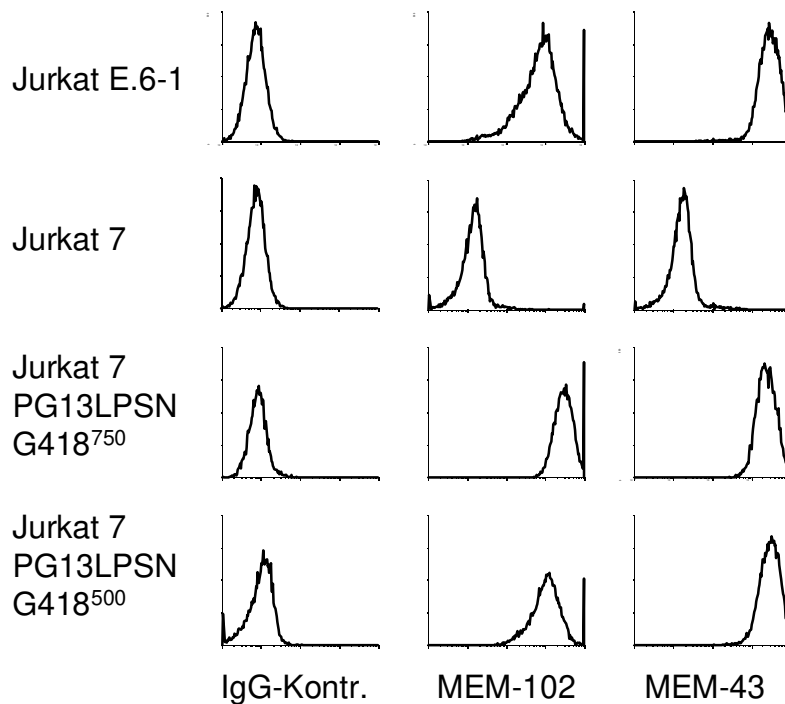
In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die Vektorplasmide nach Transfektion in GPI-defiziente Jurkat-Zellen zu einer Reexpression GPI-verankerter Oberflächenmoleküle in diesen Zellen führte. Es wurde auch demonstriert, daß sich nach Transfektion von ecotropen GP+E86 Verpackungszellen G418-resistente Kolonien bildeten, wodurch bewiesen wurde, daß auch das Neo-Resistenzgen exprimiert wurde. Die Zellen bildeten rekombinante Viren, die einen horizontalen Transfer der G418-Resistenz ermöglichten.

Es mußte als nächstes überprüft werden, ob die rekombinanten Retroviren, welche die Vektoren enthielten, in der Lage waren, die GPI-defizienten Jurkat-Zellen zu infizieren und den GPI-Ankerdefekt stabil zu komplementieren.

#### 3.4.2.1 Stabile Transduktion von GPI-defizienten Jurkat-Zellen mit PG13LPSN und PG13LXSN

Überstände von PG13LPSN und PG13LXSN wurden verwendet, um die GPI-defizienten Jurkat 7-Zellen zu infizieren. Nach der Infektion wurden die transduzierten Zellen in doppelten Ansätzen jeweils mit 500 µg/ml G418 und mit 750 µg/ml G418 selektioniert. Nach etwa zwei bis drei Wochen bestanden die verschiedenen Ansätze nur aus G418-resistenten Zellen. Diese Zellen waren es auch, die in den Apoptoseexperimenten in Abschnitt 3.1.3.2 eingesetzt wurden. Die G418-resistenten PG13LPSN transduzierten Jurkat 7-Zellen (Jurkat 7P) zeigten eine Reexpression GPI-verankerter Oberflächenmoleküle, die PG13LXSN transduzierten Jurkat 7-Zellen (Jurkat 7X) zeigten keine GPI-verankerten Oberflächenmoleküle.

Um zu untersuchen, ob die Expression GPI-verankerter Proteine auf Jurkat 7P-Zellen auch ohne Selektion stabil blieb, wurden die Zellen ohne G418 für einen Zeitraum von sechs Monaten in Kultur gehalten. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen GPI-verankerte Proteine inkubiert und im FACS gemessen. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27: Transduktion von Jurkat 7 mit PG13LPSN**

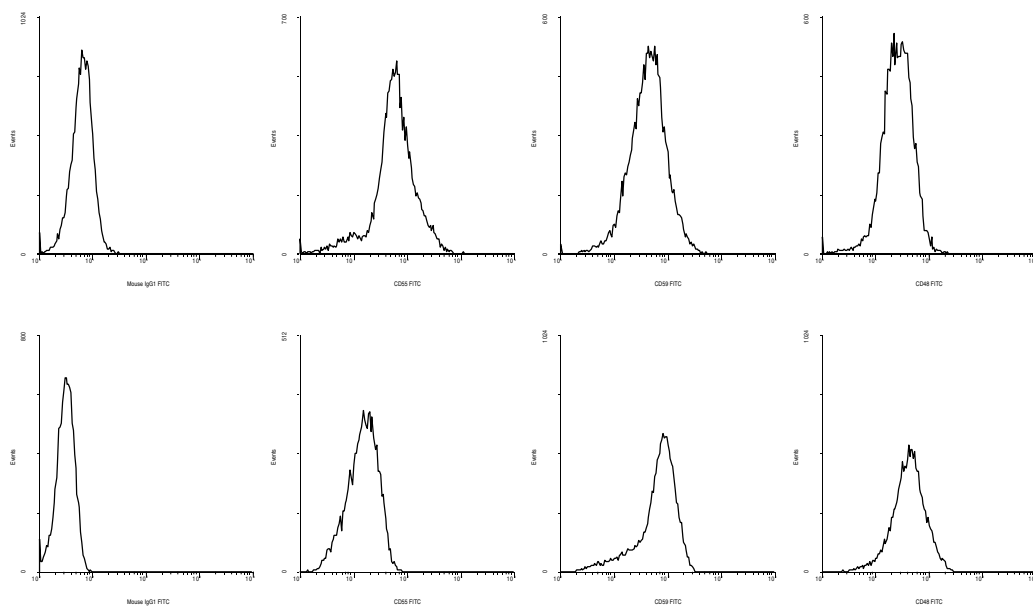
Durchflußzytometrische Analyse der mit PG13LPSN transduzierten Jurkat 7 ein halbes Jahr nach Transduktion im Vergleich zu den Jurkat E.6-1 und den nicht transduzierten Jurkat 7. Die hochgestellten Zahlen hinter G418 geben an, mit welcher Konzentration von G418 die Zellen ursprünglich selektioniert wurden. Das erste Histogramm jeder Reihe zeigt die Antikörperisotypkontrolle, das zweite eine Färbung mit MEM-102, einem gegen CD48 gerichteten mAk, und das dritte Histogramm eine Färbung mit MEM-43, einem Antikörper gegen CD55.

Dieser Versuch hat gezeigt, daß die rekombinanten PG13LPSN-Viren in der Lage sind, Zellen zu infizieren, ihre provirale DNA in das Genom der Wirtszelle einzubauen und die darauf enthaltenen Gene dauerhaft zu exprimieren.

### 3.4.2.2 Transduktion von Jurkat 7-Zellen mit PG13SNIP und PG13PP

Das Ziel dieser Versuche war es, zu zeigen, daß die GPI defizienten Jurkat 7-Zellen durch Transduktion mit den Produzentenlinien PG13SNIP bzw. PG13PP eine Reexpression der GPI-verankerten Oberflächenproteine zeigten.

Für diesen Versuch wurden gefilterte Überstände der Produzentenzellen PG13SNIP und PG13PP zu Jurkat 7-Zellen mit 5µg/ml Protaminsulfat gegeben. Nach 24 Std. wurden die Zellen mit 750 µg/ml G418 inkubiert. Nach vier Wochen wurden die Zellen dann mit Antikörpern gegen CD48, CD55 und CD59 inkubiert und im FACS gemessen (Abbildung 28).



**Abbildung 28: Transduktion von Jurkat 7-Zellen mit PG13SNIP und PG13PP**

Jurkat 7-Zellen wurden mit Überständen von PG13PP (obere Reihe) und PG13SNIP (untere Reihe) transduziert. Die Zellen wurden, von links nach rechts, mit einem murinen Kontrollantikörper, CD55, CD59 und CD48 mAk inkubiert.

Die durchflußzytometrischen Analysen haben gezeigt, daß die Zellen nach Transduktion mit PG13PP und PG13SNIP GPI-verankerte Moleküle exprimierten. Im Vergleich zur Isotypkontrolle zeigten alle verwendeten Antikörper eine leichte, aber eindeutige Verschiebung nach rechts.

### 3.4.3 Transduktion von CD34<sup>+</sup>-Zellen von Normalspendern

Nachdem erfolgreich rekombinante Viren hergestellt wurden, die in der Lage waren, humane Zelllinien zu infizieren, ihre provirale DNA stabil in das Genom der Wirtszelle einzubauen und die einklonierten Gene dauerhaft zu exprimieren, mußte als nächstes nachgewiesen werden, daß dieses System auch auf CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Vorläuferzellen übertragbar ist. Es galt, den Beweis zu erbringen, daß die Vorstimulationen, die in Abschnitt 3.3 beschrieben wurden, tatsächlich einen effizienten Gentransfer in hämatopoetische Progenitoren ermöglichen. Die Inkubationen mit Wachstumsfaktoren, insbesondere mit IL-3, IL-6 und SCF haben ergänzend zu den bisher untersuchten Bedingungen den zusätzlichen Einfluß, daß die Bindung von Retroviren an CD34<sup>+</sup>-Zellen erhöht wird, was eine effektive Infektion dieser Zellen verbessert (Crooks and Kohn 1993).

Die Experimente, die in diesem Abschnitt beschrieben sind, befassen sich mit den Bedingungen, die erforderlich sind, um einen möglichst effizienten Gentransfer in CD34<sup>+</sup>-Zellen zu erreichen. Durch Variationen in den Infektionsprotokollen sollte nach und nach die Effizienz des Gentransfers gesteigert werden.

#### 3.4.3.1 Untersuchungen zum Einfluß von Polykationen auf die Transduktionseffizienz

Der Infektion einer Zelle durch ein rekombinantes Retrovirus muß immer die Bindung des Virus an den entsprechenden zellulären Rezeptor vorangehen. Retroviren sind behüllte Viren. D. h., sie haben, genau wie Zellen, eine Membran, die sie umgibt. Genau wie die Zellen trägt die Virusmembran eine negative Ladung. Kommen nun Virus und Zelle in räumliche Nähe, verursachen die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den beiden Membranen eine Inhibition der Bindung des Virus an den zellulären Rezeptor. Die Zugabe von Polykationen, wie Polybrene oder Protaminsulfat, kann diese Abstoßung vermindern.

Um den Einfluß von Polybrene und Protaminsulfat auf die Infektion von CD34<sup>+</sup>-Zellen zu untersuchen, wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Leukapharesematerial angereichert und für drei Tage mit SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L in Stromamedium stimuliert. Anschließend wurden die

Zellen abzentrifugiert, in gefiltertem virushaltigem Überstand von GP+envAm12LPSN-Zellen resuspendiert und auf drei Proben aufgeteilt. Der erste Ansatz wurde so belassen, dem zweiten Ansatz wurden 5 µg/ml Protaminsulfat zugesetzt und dem dritten Ansatz 7,5 µg/ml Polybrene. Nach einer 24stündigen Inkubation wurden die Zellen in jeweils doppelten Ansätzen mit und ohne G418 in Methylcellulosemedium mit einer Dichte von 1.000 Zellen pro Platte ausgesät. Nach 14 Tagen wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Tabelle 5 zusammengefaßt.

**Tabelle 5: Einfluß von Polykationen auf die Transduktionseffizienzen**

|            | - G418 |        | + G418 (750 µg/ml) |        | Effizienz |
|------------|--------|--------|--------------------|--------|-----------|
|            | BFU-E  | CFU-GM | BFU-E              | CFU-GM |           |
| nur        | 2      | 45     | 0                  | 5      |           |
| Virus      | 5      | 42     | 0                  | 2      |           |
|            | 3,5    | 43,5   | 0                  | 3,5    | 7,4 %     |
| 5 µg/ml    | 2      | 36     | 1                  | 1      |           |
| Protamins. | 0      | 26     | 0                  | 5      |           |
|            | 1      | 31     | 0,5                | 3      | 10,9 %    |
| 7,5 µg/ml  | 2      | 23     | 0                  | 0      |           |
| Polybrene  | 4      | 38     | 0                  | 9      |           |
|            | 3      | 30,5   | 0                  | 4,5    | 13,2 %    |

Auswertung des Einflusses von Polykationen auf die Effizienz der Infektion CD34<sup>+</sup>-Zellen. Angereicherte CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden nach Vorstimulation für drei Tage mit GP+envAm12LPSN-Überstand mit oder ohne Polykationen infiziert und anschließend in Methylcellulosemedium mit/ohne G418 inkubiert. Die Auszählung der Kolonien sowie die daraus errechnete Transduktionseffizienz ist in der Tabelle dargestellt. Die Zahl unter der Doppellinie gibt jeweils den Mittelwert für zwei Platten an.

Wurden die Zellen mit Virus alleine, d. h., ohne Polykationen infiziert, geschah dies mit einer geringen Effizienz von etwa 7 - 8 %. Die Zugabe von Protaminsulfat steigerte die Effizienz um 50 %, die Zugabe von Polybrene führte sogar zu einer Transduktionseffizienz von mehr als 13 %. Dieses Experiment führte zu der Erkenntnis, in allen weiteren Experimenten ein Polykation zur Steigerung der Transduktionseffizienz zu

verwenden. Obwohl die Inkubation mit Polybrene etwas bessere Ergebnisse erzielte, wurde in den folgenden Experimenten Protaminsulfat als Polykation ausgewählt, da Polybrene über eine gewisse Toxizität gegenüber CD34<sup>+</sup>-Zellen verfügt (Flasshove et al. 1995).

### 3.4.3.2 Infektion von CD34<sup>+</sup>-Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren

In dem nachfolgenden Experiment sollte festgestellt werden, ob eine Inkubation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren einen Einfluß auf die Effizienz der Infektion hatte. Dieses Experiment diente lediglich zur Absicherung, daß die gewählte Zusammensetzung an Faktoren keine inhibierenden Effekte auf die Transduktion hatten.

**Tabelle 6: Einfluß der Zytokinstimulation auf die retrovirale Transduktion**

| Faktoren                  | - G418 |        | + G418 [750 µg/ml] |        | Effizienz |
|---------------------------|--------|--------|--------------------|--------|-----------|
|                           | BFU-E  | CFU-GM | BFU-E              | CFU-GM |           |
| SCF, IL-3, Flt3-L         | 1      | 14     | 0                  | 0      | 0 %       |
| SCF, IL-3, IL-6, Flt3-L   | 1      | 61     | 0                  | 9      | 14,5 %    |
| SCF, IL-3, Flt3-L, GM-CSF | 1      | 48     | 0                  | 8      | 16,3 %    |
| GM-CSF                    | 0      | 25     | 0                  | 4      | 16 %      |

Die Tabelle zeigt die Auszählung von Koloniezahlen mit/ohne Selektion mit G418 nach Vorstimulation von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit verschiedenen Kombinationen von Zytokinen (erste Spalte) und anschließender Infektion mit GP+envAm12LPSN. Die Effizienzen (letzte Spalte) wurden als Prozentsatz G418-resistenter Kolonien bezogen auf die Koloniezahl ohne G418 berechnet.

CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden aus Leukapharesematerial mit dem 'CD34 Progenitor cell isolation Kit' angereichert und für drei Tage mit verschiedenen Kombinationen von Wachstumsfaktoren, wie in Tabelle 6 gezeigt, in einem 100 µl-Ansatz inkubiert. Zu  $1 \times 10^4$  dieser Zellen wurde dann 1 ml gefilterter virushaltiger Überstand von GP+envAm12LPSN-Zellen in der Anwesenheit von 5 µg/ml Protaminsulfat gegeben. Nach 24 Std. wurden jeweils 1.000



Zellen in Methylcellulosemedium mit bzw. ohne G418 ausplattiert. Nach 14 Tagen wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt.

Die berechneten Transduktionseffizienzen aus Tabelle 6 wichen in den Stimulationsansätzen, die in den unteren drei Zeilen dargestellt sind, nur unwesentlich voneinander ab, besonders bei der Betrachtung der geringen statistischen Basis. Die Ähnlichkeiten in der Effizienz zwischen den Ansätzen zwei und drei waren nicht weiter überraschend, da diese beiden Kombinationen von Wachstumsfaktoren auch in den Stimulationsansätzen ein vergleichbares Wachstum zeigten. Der vierte Ansatz, der mit GM-CSF alleine stimuliert wurde, hatte die gleiche Transduktionseffizienz, was auf den ersten Blick ungewöhnlich erschien. Ein Vergleich der Zelltitel nach der Infektion zeigte während der Infektionszeit ein Wachstum in den Ansätzen zwei ( $1,3 \times 10^4$ ) und drei ( $1,5 \times 10^4$ ), wogegen die Zellzahl in Ansatz vier leicht zurückgegangen war ( $9 \times 10^3$ ). In den Ansätzen zwei und drei war somit eine sehr viel höhere Zellzahl infiziert als in Ansatz vier. Daß es in dem ersten Ansatz zu keiner meßbaren Infektion kam, war nicht verständlich, da auch in diesem Ansatz in der Infektionszeit eine Proliferation stattgefunden hat (Zellzahl  $1,1 \times 10^4$ ). Dieses Experiment stützt die vorher gemachte Annahme, daß die sog. Standardzytokinkombination geeignet ist, CD34<sup>+</sup>-Zellen derart vorzustimulieren, daß eine effiziente Infektion möglich ist.

#### **3.4.3.3 Infektion CD34<sup>+</sup>-Zellen durch Kokultur mit Produzentenzellen**

Eine weitere Möglichkeit, Zellen zu infizieren, besteht in der Kokultivierung der Zielzellen mit retroviralen Produzentenlinien (Eckert et al. 1996, Flasshove et al. 1995). Vor der eigentlichen Infektion sollten die Produzentenzellen bestrahlt oder mit Mitomycin behandelt werden, damit diese sich nicht weiter teilen und die anderen Zellen überwachsen, besonders wenn es sich um langsam wachsende hämatopoetische Vorläuferzellen handelt. Die unmittelbare Nähe der Zielzellen zu den Virusproduzenten sollte so zu einer erhöhten Transduktionseffizienz führen.

Tabelle 7: Transduktionseffizienzen nach Kokultur mit Produzentenzellen

| Produzenten-<br>linie | - G418 |        | + G418 (750 µg/ml) |        | Effizienz |
|-----------------------|--------|--------|--------------------|--------|-----------|
|                       | BFU-E  | CFU-GM | BFU-E              | CFU-GM |           |
| PG13LPSN              | 0      | 0      | 0                  | 3      |           |
| Versuch 1             | 0      | 8      | 0                  | 2      |           |
|                       | 0      | 4      | 0                  | 2,5    | 62,5 %    |
| PG13LPSN              | 0      | 10     | 0                  | 7      |           |
| Versuch 2             | 0      | 14     | 0                  | 9      |           |
|                       | 0      | 12     | 0                  | 8      | 66,7 %    |
| PG13LXSN              | 2      | 19     | 0                  | 6      |           |
| Versuch 1             | 0      | 16     | 1                  | 10     |           |
|                       | 1      | 17,5   | 0,5                | 8      | 45,9 %    |
| PG13 LXSN             | 2      | 12     | 0                  | 0      |           |
| Versuch 2             | 0      | 10     | 0                  | 3      |           |
|                       | 1      | 11     | 0                  | 1,5    | 12,5      |
| PA317LPSN             | 42     | 290    | 2                  | 91     |           |
|                       | 48     | 356    | 4                  | 127    |           |
|                       | 44     | 323    | 3                  | 109    | 30,5 %    |

Die Tabelle zeigt die Auszählung von Koloniezahlen mit bzw. ohne Selektion mit G418 nach Kokultivierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit Produzentenzellen. Die Effizienzen wurden als Prozentsatz G418-resistenter Kolonien bezogen auf die Koloniezahl ohne G418 berechnet. Die Zahl unter der Doppellinie gibt jeweils den Mittelwert für zwei Platten an.

Aus Leukapharesematerial wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen mit dem 'CD34 Progenitor cell isolation Kit' angereichert, die mit SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L drei Tage lang stimuliert wurden. Am dritten Tag wurden jeweils zwei Klone von präkonfluenten PG13LPSN und PG13LXSN mit Mitomycin behandelt, so daß die Produzentenzellen zwar Viren produzieren, sich aber nicht mehr teilen konnten. Eine weitere Produzentenlinie, die PA317LPSN, wurde nicht mit Mitomycin behandelt. Die stimulierten CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden auf den Produzentenzellen ausgesät und 24 Std. mit diesen zusammen mit 5 µg/ml Protaminsulfat kultiviert. Die Zellen, die sich dann leicht von den Produzentenzellen abspülen ließen, wurden in Methylecellulosemedium in doppelten Ansätzen mit und ohne G418 ausplattiert. Nach 14 Tagen wurden die gebildeten Kolonien gezählt (Tabelle 7).

Dieses Experiment zeigte eine Verbesserung der Transduktionseffizienzen gegenüber den bisher durchgeführten Infektionen. Die Kokultur mit PA317LPSN erbrachte hier mit einer Transduktionseffizienz von 30 % - wegen der großen Koloniezahlen - das deutlichste Resultat. Bei der Betrachtung des Mittelwertes der beiden Versuche mit PG13LXSN wurde eine vergleichbare Transduktionseffizienz erzielt (29,2 %). Lediglich die beiden Versuche mit PG13 LPSN wichen in ihrer Effizienz deutlich ab. Der Mittelwert für diese beiden Versuche lag mit 64,5 % etwa doppelt so hoch wie der in den anderen Versuchen. Allen fünf Versuchen war gemeinsam, daß der *colony-formation-assay* leichte bis starke Kontaminationen durch Produzentenzellen zeigte. Besonders auffällig war in diesem Zusammenhang, daß die meisten Kolonien in unmittelbarer Nähe von Produzentenzellen entstanden. Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, daß es sich entweder um Satellitenkolonien handelte, oder daß weitere Infektionen während der ersten Tage der Selektion mit G418 erfolgten. Von diesen Infektionen waren in erster Linie die Zellen betroffen, die sich in direkter Nachbarschaft zu den Produzentenzellen befanden. Die beiden Versuche mit PG13LPSN zeigten die größten Kontaminationen durch Produzentenzellen, wodurch sich möglicherweise die stark erhöhten Transduktionseffizienzen erklären lassen.

Die Kokultur mit bestrahlten oder Mitomycin behandelten Produzentenzellen sollte nur mit solchen Zellen erfolgen, die stark proliferieren, so daß sich Kontaminationen durch Verpackungszellen, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit entstehen, wenn man die infizierten Zellen abspült, schnell verdünnen und so nicht in andere Experimente verschleppt werden, deren Ergebnisse möglicherweise verfälscht werden könnten. Auf CD34<sup>+</sup>-Zellen sollte dieses Verfahren nur in sehr frühen Vorversuchen angewandt werden, wenn lediglich festgestellt werden sollte, ob ein System funktioniert und keine differenzierte quantitative Aussage getroffen werden sollte.

#### **3.4.3.4 Transduktion CD34<sup>+</sup>-Zellen von Normal Spendern auf mit Retronectin beschichteten Zellkulturschalen**

Eine weitere, sehr effektive Methode, retroviralen Gentransfer in hämatopoetische Zellen durchzuführen, beruht auf der Verwendung veränderter Fibronectinfragmente. Es konnte gezeigt werden, daß hämatopoetische Zellen an das chemisch prozessierte carboxy-ter-

minale 30/35-kD-Fragment von Fibronectin binden (Williams et al. 1991). So gebundene Zellen ließen sich mit einer erhöhten Effizienz retroviral transduzieren (Moritz et al. 1994). Diese erhöhten Infektionsraten ließen sich auf eine direkt Bindung des Virus an das Fibronectin zurückführen, wodurch Zelle und Virus in unmittelbare Nähe gebracht wurden (Moritz et al. 1996). Mittlerweile gibt es dieses Fragment auch rekombinant als Fibronectin-Fragment CH-296 mit dem kommerziellen Namen Retronectin. Mit diesem Fragment wurde Transduktionseffizienzen bis zu 98 % erreicht (Schilz et al. 1998).

**Tabelle 8: Einfluß von Retronectin auf die Transduktionseffizienz**

|             | - G418 |        |         | + G418 (600 µg/ml) |        |         | Effizienz |
|-------------|--------|--------|---------|--------------------|--------|---------|-----------|
|             | BFU-E  | CFU-GM | CFU-Mix | BFU-E              | CFU-GM | CFU-Mix |           |
| ohne Virus  | 94     | 312    | 7       | 21                 | 16     | 0       |           |
|             | 134    | 287    | 6       | 30                 | 19     | 0       |           |
|             | 114    | 299,5  | 6,5     | 25,5               | 17,5   | 0       | 10,2 %    |
| 5 µg/ml     | 131    | 262    | 13      | 85                 | 94     | 2       |           |
| Protamins.  | 152    | 302    | 11      | 31                 | 13     | 1       |           |
|             | 141,5  | 282    | 12      | 58                 | 53,5   | 1,5     | 25,9 %    |
| 9,6 µg/ml   | 121    | 239    | 0       | 38                 | 38     | 3       |           |
| Retronectin | 129    | 256    | 0       | 68                 | 90     | 2       |           |
|             | 125    | 247,5  | 0       | 53                 | 64     | 2,5     | 32,1 %    |
| 50 µg/ml    | 167    | 198    | 9       | 78                 | 76     | 1       |           |
| Retronectin | 134    | 169    | 3       | 72                 | 91     | 2       |           |
|             | 150,5  | 183,5  | 6       | 75                 | 83,5   | 1,5     | 47,1 %    |
| 50 µg/ml    | 161    | 212    | 9       | 49                 | 133    | 0       |           |
| Retronectin | 129    | 188    | 10      | 30                 | 108    | 0       |           |
|             | 145    | 200    | 9,5     | 39,5               | 120,5  | 0       | 45,1 %    |

In dieser Tabelle ist die Zahl der Kolonien, unterschieden nach BFU-E, CFU-GM und CFU-Mix mit bzw. ohne Selektion mit G418 nach Infektion mit gefiltertem Überstand von PG13SNIP mit verschiedenen Verfahren dargestellt. Die Effizienzen wurden als Prozentsatz G418-resistenter Kolonien, bezogen auf die Koloniezahl ohne G418, berechnet. Die Zahl unter der Doppellinie gibt jeweils den Mittelwert für zwei Platten an.

Für dieses Experiment wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem Knochenmark eines Normalspenders mit dem 'CD34 Multisort-Kit' angereichert und für drei Tage mit SCF, IL-3, IL-6 und

Flt3-L stimuliert. Die Zellen wurden für die verschiedenen Ansätze aufgeteilt, abzentrifugiert, in virushaltigem gefilterten Überstand resuspendiert und in die Vertiefungen einer 24-Loch-Platte gegeben, die mit unterschiedlichen Konzentrationen Retronectin beschichtet wurden. Dieses Infektionsprotokoll wurde ohne die Anwesenheit eines Polykations im Medium durchgeführt. Als Kontrollen wurden in diesem Experiment zum einen Zellen ohne Virus inkubiert, zum anderen wurde eine normale Infektion mit gefiltertem Überstand und 5 µg/ml Protaminsulfat durchgeführt. Nach einer 24stündigen Inkubation wurden die Zellen in jeweils doppelten Ansätzen in Methylcellulosemedium mit und ohne G418 ausgesät. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien ausgezählt. Das Ergebnis ist in Tabelle 8 dargestellt.

Die Auswertung zeigt, daß sich selbst bei dem Ansatz auf den Schalen mit G418 Kolonien gebildet hatten, dem kein Virus zugesetzt wurde. Die Ursache bestand in der zu geringen Konzentration an G418, so daß dieser Wert als Hintergrundwert zu berücksichtigen war und alle anderen Effizienzen um diesen Wert vermindert werden mußten. Rechnet man diese 10,2 % von der Prozentzahl für die mit Protaminsulfat infizierten Effizienz ab, so ist der Wert vergleichbar mit dem, der in Abschnitt 3.4.3.2 beschrieben wurde. Wurde die Infektion auf mit Retronectin beschichteten Platten durchgeführt, so war schon in der geringen Konzentration von 9,6 µg/ml eine Steigerung der Transduktionseffizienz auf über 20 % erkennbar. Die Effizienz ließ sich durch eine Erhöhung der Retronectin-Konzentration noch bis auf ca. 35 % steigern, was bereits über dem Prozentsatz der Kokultur mit Verpackungszellen lag.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit und um auszutesten, ob sich die Transduktionseffizienz bei weiterer Konzentrationserhöhung des Retronectins noch weiter steigern ließ, wurde der Versuch mit den gleichen Anfangsbedingungen wiederholt, d. h., Zellen vom gleichen Spender wurden unter den gleichen Bedingungen vorstimuliert. Jedoch wurden die Platten diesmal mit 50 und mit 96 µg/ml Retronectin beschichtet. Es wurden auch die gleichen Kontrollen wie in dem vorangegangenen Experiment durchgeführt. Die Konzentration des G418 wurde von 600 µg/ml auf 800 µg/ml erhöht, um auszuschließen, daß sich aus nicht-infizierten Zellen unter Selektionsdruck Kolonien bilden konnten. Tatsächlich bildeten sich in der Kontrolle ohne Virus unter G418-Selektion keine Kolonien. Das Resultat der Auszählung der gebildeten Kolonien ist in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Einfluß der Konzentration von Retronectin auf die Transduktionseffizienz

|             | - G418 |        | + G418 (800 µg/ml) |        | Effizienz |
|-------------|--------|--------|--------------------|--------|-----------|
|             | BFU-E  | CFU-GM | BFU-E              | CFU-GM |           |
| 5 µg/ml     | 2      | 2      | 0                  | 0      |           |
| Protamins.  | 1      | 1      | 0                  | 1      |           |
|             | 1,5    | 1,5    | 0                  | 0,5    | 17 %      |
| 50 µg/ml    | 41     | 58     | 11                 | 15     |           |
| Retronectin | 43     | 46     | 21                 | 18     |           |
|             | 42     | 52     | 16                 | 16,5   | 35 %      |
| 50 µg/ml    | 6      | 8      | 4                  | 4      |           |
| Retronectin | 6      | 5      | 2                  | 0      |           |
|             | 6      | 6,5    | 3                  | 2      | 40 %      |
| 96 µg/ml    | 44     | 37     | 8                  | 7      |           |
| Retronectin | 21     | 31     | 26                 | 41     |           |
|             | 32,5   | 34     | 17                 | 24     | 62 %      |

Diese Tabelle stellt eine Erweiterung des in Tabelle 8 dargestellten Experiments dar. Die Kolonien wurden hier allerdings nur nach BFU-E und CFU-GM unterschieden. Die Selektion wurde hier mit 800 µg/ml G418 durchgeführt, so daß sich im Kontrollansatz unter Selektion mit G418 ohne Virus keine Kolonien bildeten.

Ein Vergleich dieses Experimentes mit dem vorangegangenen zeigte ein ähnliches Ergebnis für den Ansatz mit Protaminsulfat und die beiden Ansätze mit 50 µg/ml Retronectin. Eine Erhöhung der Retronectinkonzentration auf die vom Hersteller als Maximum empfohlene Konzentration von 96 µg/ml ergab eine weitere Steigerung der Transduktionseffizienz auf mehr als 60 %.

Es handelt sich bei diesem Verfahren um eine sehr einfache und effektive Methode, retroviralen Gentransfer wirkungsvoller zu machen. Dieser Methode ist, will man einen Gentransfer in CD34<sup>+</sup>-Zellen durchführen, gegenüber allen anderen bisher angewandten Methoden den Vorzug zu geben.

### 3.4.4 Transduktion von CD34<sup>+</sup>-Zellen von PNH-Patienten

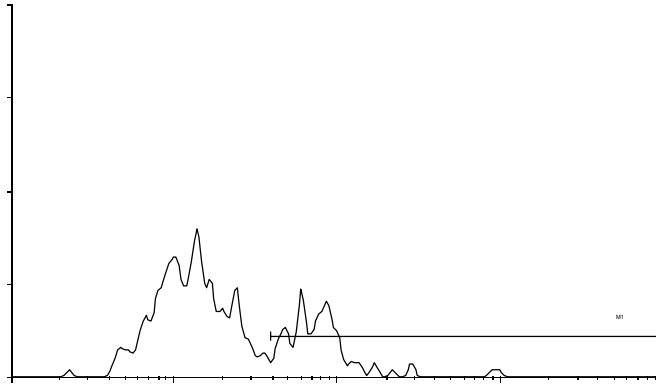
Alle bisher gewonnenen Erkenntnisse sollten in diesem Abschnitt zusammengefasst werden, um so zeigen zu können, daß es möglich ist, einen effektiven Gentransfer in CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen von PNH-Patienten durchzuführen. Nach Transduktion sollten diese Progenitorzellen GPI-verankerte Oberflächenmoleküle auf der Zelloberfläche exprimieren.

#### 3.4.4.1 Infektion von CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen eines PNH-Patienten durch Kokultur mit Produzentenzellen

Ein Experiment bestand darin, zu zeigen, daß solch ein Gentransfer mit eben dieser Wirkung möglich ist. Zu diesem Zweck wurden CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen eines PNH-Patienten mit dem 'CD34 Multisort Kit' angereichert, für drei Tage mit SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L vorstimuliert und für 24 Std. mit PA317LPSN kokultiviert. Ein Teil der Zellen wurde in jeweils doppelten Ansätzen in Methylcellulosemedium +/- G418 ausgesät. Die übrigen Zellen wurden einen weiteren Tag in Stammzellmedium inkubiert, dann mit einem Antikörper gegen CD59 inkubiert und im FACS gemessen. Die Auszählung der Kolonien nach zwei Wochen ergab drei Kolonien auf beiden Platten ohne G418 und eine Kolonie auf den beiden Platten mit G418, was zwar einer berechneten Effizienz von 33 % entsprach, jedoch aufgrund der statistischen Basis von insgesamt vier Kolonien wertlos war. Die FACS-Analyse zeigte parallel ein anderes Ergebnis (Abbildung 29).

Ursprünglich wurden die Zellen mit einem Anteil CD59<sup>-</sup>-Zellen von 85 % in den Versuch eingesetzt. Nach der Infektion war nur noch ein Anteil von 71 % CD59<sup>-</sup>-Zellen vorhanden, so daß 16 % der CD59<sup>-</sup>-Zellen transduziert waren und das GPI-verankerte CD59 auf der Zelloberfläche reexprimierten.

Dieses Experiment hat gezeigt, daß man GPI-defiziente hämatopoetische Progenitorzellen von PNH-Patienten transduzieren kann, so daß diese GPI-verankerte Oberflächenproteine reexprimieren.



**Abbildung 29: Infektion CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen eines PNH-Patienten durch Kokultur**

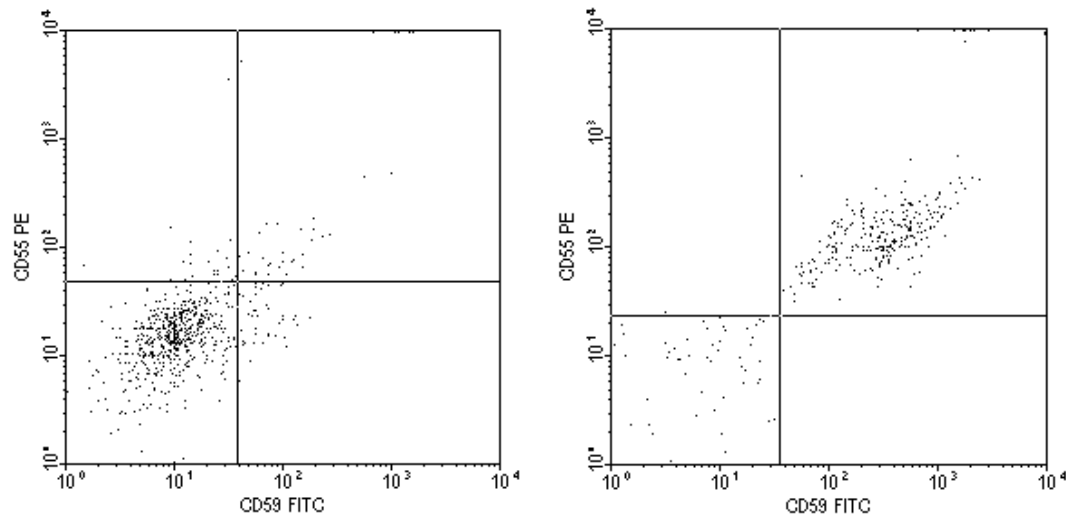
Dieses Histogramm zeigt CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen nach Kokultur mit PA317LPSN. Die Zellen wurden mit einem CD59 mAk inkubiert. Die Markierung zeigt die CD59<sup>+</sup>-Zellen (29 %).

#### **3.4.4.2 Transduktion CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen eines PNH-Patienten nach dem Retronectin-Protokoll**

Das vorher beschriebene Experiment hat gezeigt, daß ein *PIG-A* Gentransfer In GPI-defiziente Zellen von PNH-Patienten generell möglich ist. Das folgende Experiment sollte zeigen, daß dieser Gentransfer unter Anwendung der optimierten Bedingungen auch effektiv ist.

Hierzu wurden Knochenmarkszellen eines PNH-Patienten mit dem 'CD34 Multisort Kit' aufgereinigt. Die CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen wurden dann in Stromamedium mit SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L für drei Tage vorstimuliert und ein Teil der Zellen dann mit CD55 mAk und CD59 mAk inkubiert. Die übrigen Zellen wurden abzentrifugiert, in filtriertem Überstand von PG13SNIP resuspendiert, in eine mit 96 µg/ml Retronectin beschichtete Vertiefung einer Zellkulturplatte gegeben und für 24 Std. inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert und einen Tag in Stromamedium mit SCF, IL-3, IL-6 und Flt3-L weiter inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit CD55 mAk und CD59 mAk inkubiert und im FACS gemessen. Die Auswertungen der beiden FACS-Messungen sind in Abbildung 30 dargestellt.





**Abbildung 30: Infektion von CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen eines PNH-Patienten nach dem Retronectin Protokoll**

Die beiden Dot-Plots zeigen CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-separierte Zellen vor (links; 7 % CD55<sup>+</sup>CD59<sup>+</sup>) und nach Transduktion (rechts; 76 % CD55<sup>+</sup>CD59<sup>+</sup>) mit PG13SNIP-Überstand nach dem Retronectin-Protokoll.

Die Infektion erhöhte den Anteil CD59 und CD55 doppelt positiver Zellen von sieben auf 76 %. Diese Experiment hat bestätigt, daß es möglich ist, den Phänotyp der GPI-defizienten Zellen von PNH-Patienten durch retroviralen *PIG-A* Gentransfer sehr effizient zu komplementieren, so daß nach Transduktion GPI-verankerte Oberflächenmoleküle reexprimiert wurden.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden retrovirale Vektoren entwickelt, die das *PIG-A* Gen und ein selektionierbares Resistenzgen trugen. Die Funktionalität der Vektoren wurde in einer GPI-defizienten Jurkat-Linie überprüft, deren Charakterisierung ebenfalls ein Teil dieses Projektes war. Durch Transfektion der Vektoren in retrovirale Verpackungszellen wurden rekombinante Retroviren gebildet, die in der Lage waren, humane Zellen zu infizieren und eine stabile Expression der transduzierten Gene zu zeigen. In vitro Bedingungen für die Kultivierung hämatopoetischer Zellen wurden soweit optimiert, daß sie als Grundlage für einen retroviralen Gentransfer geeignet waren. Durch die Verwendung von verschiedenen Protokollen wurden dann Gentransferexperimente in humane CD34<sup>+</sup>-Zellen durchgeführt. Das optimierte Protokoll fand dann Anwendung in der Transduktion CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen von einem PNH-Patienten. Die Zellen zeigten nach Transduktion die Reexpression GPI-verankerter Oberflächenmoleküle.

### 4.1 Charakterisierung der Jurkat-Mutanten

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein System zu etablieren, das es mit verhältnismäßig einfachen Mitteln erlaubt, die Funktionalität retroviraler Vektoren oder auch der rekombinanten Retroviren zu überprüfen. Diese Zellen mußten mehrere Bedingungen erfüllen: Zum einen mußte es sich um humane Zellen handeln, zum anderen mußten sie einen Defekt im *PIG-A* Gen tragen, der eine GPI-Defizienz verursacht. Außerdem mußten sie sich gut in Kultur halten lassen. Im Gegensatz zu Zelllinien oder hämatopoetischen Vorläuferzellen, die aus PNH-Patienten stammen, lassen sich Jurkat-Zellen einfach kultivieren. Durch ihr autonomes Wachstum lassen sie sich beliebig vermehren und stehen somit in unbegrenzter Zahl zur Verfügung. Marcel Deckert aus Nizza hat Jurkat E.6-1-Zellen, also die am meisten verbreiteten Jurkat-Zellen, *in vitro* mutagenisiert und anschließend auf die Abwesenheit des GPI-verankerten CD59 selektiert. Er hat auf diese Art drei Klone gewonnen, die für diese Arbeit zur Verfügung standen. Die Klone zeigten auch eine reduzierte oder fehlende Expression anderer GPI-verankerter Proteine. Eine biochemische Analyse hatte gezeigt, daß ein Biosynthesedefekt des GPI-Ankers bereits im ersten Reaktionsschritt vorlag (Nischan 1998). Von den seinerzeit drei

bekannten Proteinen, zu dieser Zeit war das *GPI1* noch nicht kloniert, wurde nur das Pig-a Protein von einem X-chromosomalen Gen kodiert. Es war daher wahrscheinlich, daß die Klone den für diese Arbeit gewünschten Defekt im *PIG-A* Gen trugen.

Durch RT-PCR ließen sich aus allen drei Klonen die kodierenden Bereiche der *PIG-A* mRNA amplifizieren. Die Amplifikate hatten normale Größen (Abbildung 7) und die üblichen Verteilungsmuster der alternativ gespleißten Varianten (Yu et al. 1994). Die Klonierung der jeweils längsten Amplifikate und deren anschließende Sequenzierung zeigte für den Klon 1, dem Klon mit der verminderten Expression GPI-verankerter Oberflächenmoleküle, keine Veränderung der Nukleinsäuresequenz und daher auch keine Veränderungen in der Aminosäuresequenz. In den Klonen 2 und 7, beides GPI-defiziente Klone, konnte eine Missense-Mutation (Gly48Asp) identifiziert werden. Darüber hinaus zeigte die Sequenz von Klon 7 bei der ersten Sequenzierung noch eine Einzelbasendeletion, die zu einer Leserasterverschiebung und einem verfrühten Translationsstop führte. Eine weitere Amplifizierung über RT-PCR und die nachfolgende Klonierung und Sequenzierung bestätigte die Einzelbasendeletion nicht, was durch eine Amplifikation des entsprechenden genomischen Bereiches und dessen anschließende Sequenzierung verifiziert wurde.

Diese Ergebnisse zeigten, daß die verminderte Expression des Klons 1 nicht auf einen Defekt im *PIG-A* Gen zurückzuführen war. Die Ursache für die verminderte Expression könnte einerseits in einer veränderten Regulation des *PIG-A* Gens liegen oder durch eine Mutation eines anderen an der GPI Biosynthese beteiligten Gens begründet sein. Eine Transfektion mit dem Vektor pL-*PIGA*-SN zeigte keine erhöhte Expression GPI-verankerter Oberflächenproteine, so daß aus diesen Experimenten der Schluß gezogen werden konnte, daß die Ursache für die verminderte Expression GPI-verankerter Oberflächenmoleküle in diesem Klon nicht in Zusammenhang mit der Funktion des *PIG-A* Gens steht. Die Klone 2 und 7 trugen die gleiche Mutation, sind also offenbar bei der *in vitro* Mutagenisierung aus der gleichen mutierten Zelle hervorgegangen. Daß es sich trotzdem um zwei verschiedene Klone handelte, ist in Abbildung 11 zu sehen. Der Klon 7 hatte eine Anomalie in der CD3-Expression, die sich in allen bisher durchgeführten FACS-Analysen bestätigen ließ. Klon 2 dagegen zeigte eine normale Expression des CD3. Es stellte sich die Frage, ob ein Einzelbasenaustausch, selbst wenn eine geladene Aminosäure an die Stelle einer ungeladenen tritt, tatsächlich als Ursache für den GPI-Biosynthesedefekt betrachtet werden konnte. Aus diesem Grund wurden auch diese Zellen mit dem Expressionsvektor pL-*PIGA*-SN transfiziert. Die Transfektion resultierte, zumindest teilweise,

in einer Komplementation des Verankerungsdefektes. Damit sind mehrere der Kriterien erfüllt, die gegeben sein sollten, um einer Mutation einen Phänotyp zuzuschreiben (Cotton and Scriver 1998). Dadurch wurde klar gezeigt, daß die GPI-Defizienz in den Klonen 2 und 7 auf den Aminosäureaustausch zurückzuführen ist.

Die Phänotypisierung der Zellen zeigte außer der bereits erwähnten CD3-Anomalie keine Besonderheiten, die auf irgendwelche Defekte der Zellen durch die *in vitro* Mutagenisierung hindeuteten.

Durch einen Vortrag von Robert A. Brodsky (ASH-Annual meeting, Orlando 1996) wurde die Frage aufgeworfen, ob GPI-Defizienz einen generellen Schutz vor Apoptose darstellt und ob darin der relative Wachstumsvorteil der GPI-defizienten Zellen bei PNH-Patienten zu suchen sei. Wäre das der tatsächliche Mechanismus, hätte das Konzept dieser Arbeit überdacht werden müssen. Darüber hinaus wäre es denkbar, daß, sollte so ein genereller Mechanismus vorliegen, dieser Mechanismus einen Einfluß auf die hier beschriebenen Experimente haben würde. Die Messung von Apoptose nach Serumentzug (Tabelle 2, Abbildung 12) oder Induktion durch Camptothecin (Abbildung 13, Abbildung 14) zeigte keine Unterschiede für GPI-positive oder GPI-negative Jurkat-Zellen. Aus diesen Experimenten konnte der Schluß gezogen werden, daß GPI-Defizienz keinen generellen Schutz vor Apoptose bietet, sondern daß dieser Schutz auf bestimmte Zelltypen beschränkt ist und stark von dem experimentellen Aufbau abhängt.

Die hier charakterisierten Jurkat-Klone 2 und 7 tragen einen durch eine Mutation im *PIG-A* Gen bedingten Defekt der GPI-Synthese und sind somit defizient in der Expression der GPI-verankerten Oberflächenmoleküle CD48, CD55 und CD59. Dieser Defekt läßt sich durch eine Transfektion mit dem Wildtyp *PIG-A* komplementieren, so daß diese Zelllinie geeignet ist, als "PNH-Modellzelle" für den retroviralen *PIG-A* Gentransfer zu dienen.

## 4.2 Die retroviralen Vektoren und Verpackungszellen

Zwei entscheidende Parameter für die Durchführung eines effizienten retroviralen Gentransfers sind die effektive Infektion und Transkription der eingebrachten Gene. Die effek-

tive Infektion hängt zum einen vom Typ und Zustand der Zielzelle ab, zum anderen aber auch von der Zahl der infektiösen viralen Partikel und von der Interaktion der Virusproteine mit bestimmten als Rezeptor dienenden Molekülen auf der Zielzelle. Die Zahl der infektiösen Viruspartikel hängt einerseits davon ab, wie gut ein Vektor in ein Virus verpackt wird, andererseits ist es wichtig, eine leistungsfähige Verpackungszelle zu haben, die in der Lage ist, die Vektoren zu verpacken. Die Interaktion zwischen den Virusproteinen und den zellulären Virusrezeptoren wird ebenfalls durch die Wahl der Verpackungszellen bestimmt, die dem Virus eine charakteristische Hülle geben.

Ecotrope Verpackungszellen, wie die hier verwendete GP+E86, beschränken den Wirtsbereich der Viren auf Nagerzellen. Amphotrope Verpackungszellen wie PA317 und GP+envAm12 generieren Viren mit einem veränderten Oberflächenprotein, so daß das Wirtsspektrum auch humane Zellen umfaßt. Viren, die von pseudotypisierten Verpackungszellen wie PG13 hergestellt wurden, tragen das Oberflächenprotein des Gibbonaffenleukämievirus (GALV). Dadurch bekommen die Viren eine veränderte Wirtsspezifität, die eine Infektion humaner, aber keine Infektion muriner Zellen erlaubt. Bei der Infektion humaner Zellen ist zu berücksichtigen, daß amphotrope und GALV-pseudotypisierte Retroviren unterschiedliche zelluläre Proteine als Rezeptoren benutzen (Kavanaugh et al. 1994), die auf verschiedenen Zelltypen unterschiedlich verteilt sein können (Bregni et al. 1998, Yam et al. 1998).

Mittlerweile gibt es in der Vektorkonstruktion eine Vielzahl verschiedener Varianten. In der Regel besteht solch ein Vektor aus den beiden flankierenden LTR-Regionen, einer 5'-Leader Sequenz, die auch das Verpackungssignal trägt, und den einklonierten Genen. Bei diesen handelt es sich meistens um ein selektionierbares Markergen, üblicherweise ein Resistenzgen wie das Neomycin-phosphotransferasegen oder das *Multi-drug-resistance* Gen, und das *gene-of-interest*, in diesem Fall *PIG-A*. Die Transkription eines dieser Gene kann unter der Kontrolle des LTR-Promotors stehen, die des anderen benötigt einen zusätzlichen heterologen Promotor. Befinden sich aber zwei Promotoren in unmittelbarer Nähe zueinander, können sie sich gegenseitig derart beeinflussen, daß ein negativer Effekt auf die Expression eines oder beider Gene ausgeübt werden kann. Diese Strategie wurde bei den Vektoren pL-*PIGA*-SN und pSFβ1mBPIG verwendet. Zwei Möglichkeiten, solche Promotorinterferenzen zu umgehen, wurden bei den hier verwendeten Vektoren berücksichtigt. Bei bicistronischen Vektoren, wie den hier verwendeten pLPIN, pSNIP, pSFβ1mEPIG und pSFβ1mIPIG, werden beide Gene als

eine Einheit transkribiert. Zwischen beiden Genen befindet sich aber zusätzlich noch die Sequenz einer internen Ribosomenbindungsstelle (IRES), so daß von dem einen Transkript zwei Proteine translatiert werden können. Die andere Strategie zur Umgehung von Promotorinterferenzen ist in dem Vektor pSFβ1mSPIG zur Anwendung gekommen. Hier werden auch beide Gene als ein Transkript abgelesen. Durch die Verwendung des Spleißapparates der Wirtszelle wird das Transkript alternativ gespleißt, und so wird mal das eine, mal das andere Gen translatiert. Ob und wie gut Gene tatsächlich exprimiert werden, hängt sehr stark von dem Konstrukt ab und ist nicht vorhersagbar. Genausowenig ist es möglich, mit Gewissheit zu sagen, wie gut die Sequenzen in die Viruspartikel verpackt werden, d. h., welchen Titer die Virusüberstände haben würden. Aufgrund dieser mangelhaften Vorhersagbarkeit wurden überhaupt so viele verschiedene Konstrukte eingesetzt. Eine Überprüfung der Expression des *PIG-A* Gens durch Transfektion der Vektorplasmide in die GPI-defizienten Jurkat-Zellen resultierte bei allen Zellen in einer Reexpression GPI-verankerter Oberflächenmoleküle. Als nächstes stellten sich die Fragen, wie gut die verschiedenen Konstrukte verpackt würden, d. h., wie hoch die Titer und wie gut ist die Expression der Gene nach Transduktion sein würden. Bei den Vektoren mit *MDR1* ließen sich nie meßbare Virustiter erzielen. Dies war wahrscheinlich auf eine nicht ausreichende Expression des *MDR1* Gens zurückzuführen. Die Vektoren mit dem Neo-Resistenzgen ließen sich alle in virale Partikel verpacken und zeigten nach Transduktion in die GPI-defizienten Jurkat-Zellen sowohl eine Resistenz gegenüber G418 als auch die Reexpression GPI-verankerter Oberflächenmoleküle. Die gemessenen Virustiter der verschiedenen Produzentenlinien lagen etwa bei  $1 - 2 \times 10^5$  cfu/ml. Nur bei Verwendung des Vektors LPIN lag der Titer mit  $1 - 5 \times 10^4$  cfu/ml deutlich darunter, so daß dieser Vektor bei der späteren Transduktion hämatopoetischer Progenitoren nicht zur Verwendung kam. Der Hauptkritikpunkt gegen die Verwendung der Standard-M-MLV abgeleiteten Vektoren wie dem Vektor LXS<sub>N</sub>, Grundgerüst für die Klonierung von L-*PIGA*-SN, besteht darin, daß die Expression durch Methylierung abgeschaltet werden kann und der Vektor so für eine Langzeitexpression ungeeignet ist. Aus diesem Grund wurden mit L-*PIGA*-SN transduzierte Jurkat 7-Zellen nach einer anfänglichen Selektionsphase, nach der alle Zellen GPI-positiv waren, für die Dauer eines halben Jahres ohne Selektionsdruck durch G418 weiterkultiviert. Es zeigte sich kein Rückgang der Zahl der GPI-positiven Zellen. Damit wurde gezeigt, daß dieser Vektor eine stabile Expression in humanen Zellen gewährleistet. Der Vektor pSNIP trägt diese methylierungssensitiven Stellen, die bisher in Zusammenhang mit einer Abschaltung der Genexpression in Zusammenhang gebracht wurden (Challita and Kohn 1994), nicht (Baum et al. 1995).

Mit den beiden Vektoren SNIP und L-*PIGA*-SN sind zwei Vektoren charakterisiert, die eine gute und dauerhafte Expression zeigen und von den Produzentenzellen in ausreichenden Titern gebildet werden.

Die beiden amphotropen Verpackungslinien PA317 und GP+envAm12 zeigten in den durchgeführten Experimenten gute Titer und auch eine gute Infektion der CD34<sup>+</sup>-Zellen. Beide wurden jedoch nur eine begrenzte Zeit verwendet. Die PA317-Zellen als Verpackungszellen der sog. zweiten Generation bilden ab und zu infektiöse Helferviren (Bosselman et al. 1987) und sind somit als nicht so sicher einzustufen wie die GP+envAm12- und die PG13-Zellen, beides Zellen der sog. dritten Generation. Diese Zellen gelten als sicher bezüglich des Auftretens von Helferviren, und eine solche Entstehung von Helferviren wurde bisher auch noch nicht berichtet (Günzburg and Salmons 1997). Die PA317-Zellen zeigten in den hier beschriebenen Experimenten keine Vorteile gegenüber den anderen beiden, so daß keine Notwendigkeit bestand, sie weiterzuverwenden. Die GP+envAm12 ließen sich sehr schlecht kultivieren. Auch bei bester Pflege kam es nach einer gewissen Kulturzeit zum Absterben aller Zellen in den Zellkulturen, so daß die Produzentenzellen immer wieder von neuem aufgetaut oder angelegt werden mußten. Darüber hinaus zeigten sie keine besseren Titer und Transduktionseffizienzen als die PG13-Zellen, womit auf die Verwendung dieser Zellen gut verzichtet werden konnte. Außerdem sind amphotrope Verpackungszellen nicht sehr gut geeignet für die Infektion der sehr primitiven hämatopoetischen Vorläuferzellen, da diese den für die amphotropen Viren wichtigen Pit-2 Rezeptor nicht exprimieren (Kiem et al. 1997, Sabatino et al. 1997, Sinclair et al. 1997).

### 4.3 Die *in vitro* Kultur hämatopoetischer Zellen

Die Stimulation angereicherter CD34<sup>+</sup>-Zellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren diente dazu, diese Zellen zur Proliferation zu bringen, ohne daß sie ausdifferenzieren. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, daß verschiedene Zytokine einen Einfluß auf die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen haben. Es war klar, daß dieses Ziel nur zu erreichen war, wenn verschiedene Faktoren miteinander kombiniert wurden. Sicher war, daß SCF auf jeden Fall zu den essentiellen Faktoren gehört. Weitere

Zytokine, die sehr wahrscheinlich wichtig für *in vitro* Kultivierung der Zellen waren, sind IL-3, IL-6 und GM-CSF. Später wurde die Liste der Stoffe, die für die *in vitro* Kultivierung von Progenitorzellen diskutiert wurden, um Flt3-L, G-CSF, Epo, IL-7, IL-11, IL-12, Tpo, *Leukemia inhibitory factor* (LIF), anti-TNF-alpha, *basic Fibroblast growth factor* (bFGF), Anti-IFN-gamma und SDF1-alpha (Emerson 1996) erweitert. Es war auch klar, daß andere Zellen des Knochenmarks einen Einfluß auf die Kultivierung der hämatopoetischen Zellen hatten. Allgemein wurde beschrieben, daß die Kokultivierung hämatopoetischer Zellen mit Stromazellen, die die Gesamtheit der adhärenenten Zellen aus einem Knochenmarkaspirat darstellen, die besten Ergebnisse bezüglich der Expansion von Vorläuferzellen zeigte. Im Laufe der Zeit wurden bestimmte Teilpopulationen der Stromazellen beschrieben, die für die Kultivierung der hämatopoetischen Zellen wichtig sein können (Wineman et al. 1996). Es wurde auch beschrieben, daß Osteoblasten und murine Stromazelllinien diesen Effekt ausüben (Taichmann et al. 1996, Thiemann et al. 1998). Bei der Vielzahl an möglichen Stimulationsmöglichkeiten ergab sich die Notwendigkeit, nur einen Teil der Stoffe in verschiedenen Kombinationen gegeneinander zu testen. Die Vorläuferzellen sollten nur insoweit stimuliert werden, als daß ein effizienter retroviraler Gentransfer ermöglicht wurde. Als Maß für eine solche Stimulation wurde die Zahl der koloniebildenden Zellen, manchmal auch in Kombination mit der Zahl CD34<sup>+</sup>-Zellen, genommen.

Ein direkter Vergleich zwischen verschiedenen Experimenten war bei diesen Versuchen nur bedingt möglich, da die tatsächliche Zahl der koloniebildenden Zellen in den verschiedenen Experimenten sehr unterschiedlich sein konnte. Diese Zahl war abhängig vom Spender, der Frische der verwendeten Wachstumsfaktoren und vor allem abhängig vom verwendeten Methylcellulosemedium.

Es wurde gefunden, daß die Kombination von SCF (10 ng/ml), IL-3 (100 ng/ml), IL-6 (100 ng/ml) und Flt3-L (100ng/ml) die besten Ergebnisse bezüglich der Vermehrung koloniebildender und CD34<sup>+</sup>- Zellen zeigte. Eine Erhöhung der verwendeten Konzentrationen brachte keine nennenswerten Fortschritte, und die Kokultivierung mit Stromazellen war durch die Verwendung von Flt3-L nicht mehr nötig. Auch die Inkubation mit GM-CSF bewirkte in diesen Experimenten die Zunahme koloniebildender Zellen, aber GM-CSF wirkte auf die Proliferation aller Zellen, nicht nur der klonogenen Zellen, was im Zusammenhang mit der retroviralen Transduktion eher unerwünscht war. Die Verwendung zusätzlicher Faktoren bewirkte keine vermehrte Expansion der



koloniebildenden Zellen. Allerdings wurde beschrieben, daß Tpo auf die Erhaltung der primitiven Zellen in *in vitro* Kulturen wirkt (Borge et al. 1997).

Durch diese Experimente wurde eine 4-Faktor-Kombination gefunden, mit der es möglich ist, hämatopoetische Vorläuferzellen von gesunden Spendern und von PNH-Patienten effektiv *in vitro* zu stimulieren. Es wurde auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt, daß diese Kombination von Faktoren für die Expansion und Infektion von Progenitorzellen geeignet ist (Conneally et al. 1998, Dao et al. 1997a, Shah et al. 1996).

#### 4.4 Retrovirale Transduktion CD34<sup>+</sup>-Zellen

Die Transduktion der CD34-angereicherten Zellen wurde zuerst an Progenitoren des peripheren Blutes und des Knochenmarks etabliert. Erst im zweiten Schritt wurden die CD34<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>-Zellen von PNH-Patienten transduziert. Zu Beginn der Arbeit wurden zwei Verfahren standardmäßig verwendet. Das eine Verfahren bestand darin, Zellen in einem geeigneten Medium mit Wachstumsfaktoren zu inkubieren und zu diesen Zellen zellfrei gefilterten virushaltigen Überstand von retroviralen Produzentenzellen zu geben. Zur Reduktion der elektrostatischen Abstoßung der Membranen von Virus und Zelle wurden Polykationen wie Polybrene oder Protaminsulfat in den Ansatz gegeben. Das andere Verfahren wurde ähnlich durchgeführt, mit dem Unterschied, daß die hämatopoetischen Zellen mit Stromazellen kokultiviert wurden. Auf die Zugabe von Polykationen wurde in diesem Protokoll verzichtet. Einige Protokolle beschrieben auch die Infektion in Kokultur mit murinen Stromazelllinien oder auch in direkter Kokultur mit bestrahlten Produzentenzellen. Die erreichten Effizienzen reichten in den meisten Veröffentlichungen von 15 - 30 % für das Protokoll mit gefiltertem Überstand und von 20 - 50 % für die Kokulturprotokolle (Conneally et al. 1998, Eckert et al. 1996, Flasshove et al. 1995).

Die ersten Infektionsversuche dieser Arbeit wurden mit gefilterten Überständen von Produzentenzellen durchgeführt. Zuerst befaßten sie sich mit der Frage, welches Polykation verwendet werden sollte. Die Transduktionseffizienzen der Ansätze mit Protaminsulfat wichen kaum von denen der Ansätze mit Polybrene ab; Polybrene bewirkte sogar eine geringfügig bessere Transduktionseffizienz (Cornetta and Anderson 1989). Von Polybrene war bekannt, daß es jedoch eine zelltoxische Wirkung hat (Flasshove et al.

1995). Da sich die Effizienz in der Transduktion nur unwesentlich von dem Ansatz mit Protaminsulfat unterschied, wurde das Polybrene in den nachfolgenden Experimenten nicht mehr verwendet. In Vorexperimenten zeigte sich, daß auch das Protaminsulfat toxisch für die Zellen war, wenn die Konzentration höher als 5 µg/ml war. Die erreichten Effizienzen waren mit 15 - 20 % im Bereich dessen, was auch von anderen Arbeitsgruppen publiziert wurde (Dao et al. 1997b, Nimgaonkar et al. 1994); dennoch waren die Effizienzen niedrig.

Bestrebungen anderer Arbeitsgruppen gingen dahin, die Virustiter zu erhöhen oder die Viren stabiler zu machen. Eine Titererhöhung war am einfachsten durch Filtration oder Zentrifugation zu erreichen. Die Zentrifugation konnte aus technischen Gründen in dieser Arbeit nicht angewandt werden. Die Konzentrierung der viralen Partikel durch Filtration ist nicht ganz unumstritten, weil mit diesem Verfahren zwar Viruspartikel angereichert (Paul et al. 1993), die Transduktionsraten aber nicht erhöht werden (Forestell et al. 1995). Diese Beobachtung konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

Eine Infektion durch Kokultivierung mit Verpackungszellen zeigte eine deutlich erhöhte Transduktionseffizienz im Vergleich zur Infektion mit Überständen (Porter et al. 1996). Aufgrund der kaum zu vermeidenden Kontamination mit Verpackungszellen hatte dieses Verfahren eher experimentellen Charakter und war von untergeordneter Relevanz.

Ein tatsächlicher Fortschritt in der Steigerung der Transduktionseffizienzen wurde erst durch die Verwendung bestimmter Fibronectinfragmente, wie dem rekombinanten CH-296 bzw. Retronectin, erreicht. Durch die gleichzeitige Bindung von Zelle und Virus an das Fibronectinfragment werden diese in entsprechende räumliche Nähe gebracht und dadurch eine effiziente Infektion gewährleistet (Hanenberg et al. 1996, Moritz et al. 1994, Williams et al. 1991). So konnten mit dieser Methode selbst die frühesten Progenitorzellen, die Langzeit-repopulierenden Zellen, infiziert werden (Kiem et al. 1997, van der Loo et al. 1998). Es wurde ebenfalls beschrieben, daß die Bindung hämatopoetischer Zellen an Fibronectin die Vermehrung dieser Zellen bewirken kann (Yokota et al. 1998). Die Anwendung dieses Protokolls ermöglicht eine routinemäßige Infektionsrate von 70 % in CD34<sup>+</sup>-Zellen (T. Moritz, pers. Inf.).

Die Anwendung dieses Verfahrens zeigte auch in dieser Arbeit Transduktionseffizienzen, die reproduzierbar bei bis zu 70 % lagen. Dieses Protokoll war auch auf die Infektion GPI-

defizienter CD34<sup>+</sup>-Zellen eines PNH-Patienten übertragbar. Die Zellen, die vor Infektion eine, in Bezug auf CD55 und CD59, doppelt positive 7 % Population hatten, zeigten nach der Transduktion mit PG13SNIP eine doppelt positive Population von 76 %.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt wurde, welches es ermöglichte, GPI-defiziente hämatopoetische Vorläuferzellen effizient mit *PIG-A* zu transduzieren, so daß es bei einem Großteil der Zellen zu einer Re-expression GPI-verankerter Oberflächenmoleküle kam.

## 4.5 Ausblick

### 4.5.1 Untersuchungen zur Pathogenese der PNH

Das hier entwickelte System ermöglicht den effizienten Transfer des *PIG-A* Gens in hämatopoetische Zellen von PNH-Patienten. Dadurch ist es zum ersten Mal möglich, den tatsächlichen Einfluß der GPI-Defizienz in der Pathogenese der PNH weiter molekular zu analysieren. Bisher ist immer noch strittig, ob vielleicht eine zweite Mutation mitverantwortlich für die Entstehung der PNH sein kann. Es wäre naheliegend, zu untersuchen, wie sich die Zellen in *in vitro* Assays, wie im *colony-formation-assay* oder im LTCIC-*assay* nach Transduktion im Vergleich zu den nicht transduzierten verhalten. Doch es wurde bereits gezeigt, daß dieser Versuchsansatz nicht geeignet ist, das Wachstum GPI-positiver und GPI-negativer Zellen von PNH-Patienten zu vergleichen (Maciejewski et al. 1997). Ein System, das für diese Studien adaptiert werden könnte, ist das Xenotransplantationsmodell von Iwamoto (Iwamoto et al. 1996). In diesem System zeigten die GPI-defizienten Vorläuferzellen einen Wachstumsvorteil im Vergleich zu den GPI-positiven. Damit ist es bisher das einzige Modell, das den hämatopoetischen Zellen von PNH-Patienten eine Umgebung bietet, die es erlaubt, das unterschiedliche Wachstum der verschiedenen Zellpopulationen in der PNH zu studieren. In der Arbeit von Iwamoto et al. wurden die Zellen in die SCID-hu-Maus transplantiert. Mittlerweile hat sich aber ein anderes Mausmodell für das Studium klonaler hämatopoetischer Erkrankungen durchgesetzt, die NOD/SCID-Maus (Cashman et al. 1997, Lapidot et al. 1997). Diese Tiere zeigen nur eine schwache immunologische Aktivität, so daß es seltener zu Transplantatabstoßungen kommt. Dadurch ist möglich, auch Langzeitbeobachtungen durchzuführen.

Diese Modell kann verwendet werden, um *PIG-A* transduzierte GPI-defiziente hämatopoetische Zellen von PNH-Patienten zu transplantieren. Es geht hierbei um die Frage, wie sich die transduzierten im Vergleich zu den nicht-transduzierten Zellen in ihrem Wachstum und in der Regeneration verhalten würden. In diesem Modell ist es sogar vorteilhaft, wenn die Transduktionseffizienz nicht bei 100 % liegt sondern sich irgendwo in dem Bereich zwischen 30 und 70 % bewegt, so daß parallel zwei Populationen existieren. Würde die humane Hämatopoese nach einer gewissen Zeit von den GPI-defizienten Zellen dominiert, so wäre dies ein klarer Hinweis, daß die GPI-Defizienz den Zellen den Wachstumsvorteil verleiht. Existierten beide Zellpopulationen nebeneinander, wäre das ein Indiz dafür, daß der Wachstumsvorteil und die für die PNH verantwortliche GPI-Defizienz zwei unabhängige Prozesse sind, die bei einer PNH-Erkrankung nur zufällig zusammentreffen. Wäre dies der Fall, würde das völlig neue therapeutische Perspektiven eröffnen.

#### 4.5.2 Gentherapie für PNH

Eine Gentherapie für die PNH erscheint auf den allerersten Blick logisch, da eine Erkrankung vorliegt, die immer mit einem definierten genetischen Defekt in Zusammenhang steht. Doch bereits der zweite Blick deckt die Schwierigkeiten auf, die mit einer solchen Therapie verbunden sein könnten. Ein Klon oder einige wenige Klone, die eine erworbene Mutation tragen, setzen sich durch und dominieren die Hämatopoese. Damit es soweit kommen kann, muß eine Mechanismus vorliegen, der diesen GPI-defizienten Zellen einen Wachstumsvorteil, verglichen mit den GPI-positiven, verleiht.

Würden nun die Transplantationsexperimente in die imundefizienten Mäuse ergeben, daß der Wachstumsvorteil GPI-unabhängig wäre, könnte man die PNH gentherapeutisch behandeln, indem dem Patienten Knochenmark entnommen würde. Dieses Knochenmark würde separiert, um die Stamm- und Vorläuferzellen anzureichern; anschließend würden sie mit retroviralen Vektoren, wie sie beispielsweise in dieser Arbeit entwickelt wurden, transduziert und zurück in den Patienten gegeben. Dadurch würde der Anteil GPI-defizienter Zellen in diesen Patienten drastisch reduziert und die Symptome würden sich im Erfolgsfall vermindern. Dies würde zu einer Erhöhung der Lebensdauer

und zu einer Verbesserung der Lebensqualität dieser Patienten führen. Des weiteren könnte man solch ein Therapieprotokoll mehrmals wiederholen, so daß der Anteil der GPI-defizienten Zellen weiter reduziert würde.

Viel schwieriger wäre die Situation, wenn die Xenotransplantationsexperimente zeigen würden, daß der Wachstumsvorteil durch die GPI-Defizienz bedingt ist. Wollte man in einem solchen Fall eine Gentherapie durchführen, müßten die Vektoren erst weiterentwickelt werden. Es wären zwei Vorgehensweisen möglich, um eine solche Behandlungsstrategie durchzuführen. Eine Möglichkeit besteht darin, den *PIG-A* transduzierten Zellen einen Wachstumsvorteil zu verschaffen. Man könnte einen solchen Wachstumsvorteil erreichen, wenn man an Stelle des Neo-Resistenzgens, das *MDR1* Gen oder das Gen für die Dihydrofolatreduktase (DHFR) in den Vektor einbaut. Es wäre möglich, transduzierte Zellen durch Medikamente *in vivo* nachzuselektionieren. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, das *PIG-A* Gen unter die Kontrolle von Promotoren zu stellen, die nur in bestimmten Zelltypen oder Differenzierungsstufen aktiv sind. Der Wachstumsvorteil besteht bei PNH-Patienten auf der Ebene der pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Die Verwendung eines Promotors, der in undifferenzierten hämatopoetischen Progenitorzellen noch nicht aktiv ist und erst bei der Differenzierung zu Erythrocyten oder Megakaryozyten angeschaltet wird, würde den Vorläuferzellen ihren GPI-Defizienz bedingten Wachstumsvorteil belassen. Die ausdifferenzierten Thrombozyten und Erythrozyten wären aber vor einer Komplement-vermittelten Lyse geschützt. Der Promotor des Gens des Transkriptionsfaktors GATA-1 wäre ein möglicher Kandidat für einen solchen regulierten Promotor. Dieser Faktor ist in hämatopoetischen Stammzellen nicht aktiv und wird erst in der Differenzierung zu Erythrozyten, Megakaryozyten und Mastzellen aktiviert (Shivdasani and Orkin 1996).

## 5 Abkürzungen

|         |  |
|---------|--|
| AA      | Aplastische Anämie   |
| 7-AAD   | 7-Amino-actinomycin D  |
| abs.    | absolut  |
| Ac      | Acetat   |
| Amp     | Ampicillin   |
| APS     | Ammoniumpersulfat  |
| bp      | Basenpaare   |
| BD      | Becton Dickinson   |
| BFU-E   | <i>Burst forming unit-erythroid</i>  |
| BSA     | <i>Bovine serum albumin</i> (Rinderserum Albumin)                                  |
| CD      | <i>Cluster of differentiation</i>  |
| CFC     | <i>Colony forming cell</i> (Koloniebildende Zelle)                                 |
| CFU     | <i>Colony forming unit</i> (Koloniebildende Einheit)                               |
| cfu     | <i>Colony forming unit</i> (Einheit für die Zahl retroviral transduzierter Zellen) |
| CFU-E   | <i>Colony forming unit-erythroid</i>   |
| CFU-G   | <i>Colony forming unit-granulocyte</i>   |
| CFU-GM  | <i>Colony forming unit-Granulocyte-macrophage</i>                                  |
| CFU-M   | <i>Colony forming unit-macrophage</i>  |
| CIP     | <i>Calf intestinal phosphatase</i>   |
| CsA     | Cyclosporin A  |
| DAF     | <i>Decay accelerating factor</i> (CD55)  |
| DEPC    | Diethylpyrocarbonat  |
| DMEM    | <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>  |
| DMEM-VP | DMEM für Verpackungszellen   |
| DNA     | Desoxyribonukleinsäure   |
| DTAF    | Dichlorotriazinyl Amino Fluorescein  |
| E. coli | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA    | Ethylendiamintetraacetat   |
| EMCV    | Encephalomyocarditisvirus  |
| Epo     | Erythropoetin  |
| EtBr    | Ethidiumbromid   |
| FACS    | <i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung) |

---

|                      |  |
|----------------------|--|
| FITC                 | Fluoresceinisothiocyanat   |
| FMCF                 | <i>Friend mink cell focus forming virus</i>                                  |
| FSC                  | <i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)                                  |
| G-CSF                | Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor                                   |
| GlcNAc               | N-Acetyl-glucosamin  |
| GM-CSF               | Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor                       |
| GPI                  | Glycosylphosphatidylinositol   |
| HBSS                 | <i>Hank's buffered salt solution</i>   |
| HEPES                | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure                               |
| HRF                  | <i>Homologous restriction factor</i>   |
| Ig                   | Immunglobulin  |
| IL                   | Interleukin  |
| IPTG                 | Isopropylthiogalaktosid  |
| IMDM                 | <i>Iscoe's modified Dulbecco's medium</i>                                    |
| IRES                 | <i>Internal ribosomal entry site</i> (Interne Ribosomen Bindungsstelle)      |
| kbp                  | Kilobasenpaare   |
| LTCIC                | <i>Long-term culture initiating cell</i>                                     |
| LTR                  | <i>Long terminal repeat</i> (Lange terminale Wiederholungssequenz)           |
| MACS                 | <i>Magentic activated cell sorting</i> (Magnetaktivierte Zellsortierung)     |
| mAk                  | Monoklonaler Antikörper  |
| Man                  | Mannose  |
| MCS                  | <i>Multi cloning site</i> (Multiple Klonierungsstelle)                       |
| MDS                  | Myelodysplastisches Syndrom  |
| MESV                 | <i>Murine embryonic stem cell virus</i> (Murines embryonales Stammzellvirus) |
| MHH                  | Medizinische Hochschule Hannover   |
| MIRL                 | <i>Membrane inhibitor of reactive lysis</i> (CD59)                           |
| MMLV                 | <i>Moloney murine leukemia virus</i>   |
| neoR                 | Neomycin Phosphotransferasegen   |
| NOD                  | <i>Non obese diabetic</i>  |
| OD <sub>lambda</sub> | Optische Dichte (Bei Wellenlänge lambda)                                     |
| PI-PLC               | Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C                             |
| PCR                  | Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)                         |
| PBS                  | <i>Phosphate buffered salt solution</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)     |
| PE                   | Phycoerythrin  |
| PI                   | Phosphatidylinositol   |

---

|       |   |
|-------|---|
| PIPLC | Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C                            |
| PNH   | Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie                                       |
| Pos.  | Position  |
| RNA   | Ribonukleinsäure  |
| RT    | Reverse Transkriptase   |
| SAP   | <i>Shrimp alkaline phosphatase</i>  |
| SCF   | <i>Stem cell factor</i> (Stammzellfaktor)                                   |
| SCID  | <i>Severe combined immunodeficiency</i> (Schwerer kombinierter Immundefekt) |
| SFFVp | <i>Spleen focus forming virus (polycythemic strain)</i>                     |
| SSC   | <i>Side scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)                                   |
| TAE   | Tris-Acetat-EDTA-Puffer   |
| Taq   | <i>Thermophilus aquaticus</i>   |
| TE    | Tris-EDTA-Puffer  |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin  |
| Tpo   | Thrombopoetin   |
| U     | <i>Unit</i> (Einheit)   |
| UV    | Ultraviolett  |
| Upm.  | Umdrehungen/Min.  |
| Vol.  | Volumen   |
| X-Gal | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-glucoronid                                       |



## 6 Herstellerverzeichnis

Abimed, Langenfeld, Deutschland  
 Amersham, Braunschweig, Deutschland  
 Amgen, Thousand Oakes, USA  
 Applichem, Darmstadt, Deutschland  
 ATCC American Type Culture Collection, Rockville, USA  
 B. Braun, Melsungen, Deutschland  
 Beckmann, München, Deutschland  
 Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland  
 Biochrom KG, Berlin, Deutschland  
 Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland  
 Biozol Diagnostika Vertriebs System GmbH, Eching, Deutschland  
 Boehringer, Ingelheim, Deutschland  
 Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland  
 CellGenix Technologie Transfer GmbH, Freiburg, Deutschland  
 CellSystems Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen, Deutschland  
 Clontech GmbH, Heidelberg, Deutschland  
 Corning Costar Deutschland, Bodenheim, Deutschland  
 DAKO, Hamburg, Deutschland  
 dianova GmbH, Hamburg, Deutschland  
 Difco Laboratories, Deutschland  
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland  
 Eurogentec, Seraing, Belgien  
 Falcon, New Jersey, USA  
 Gelaire, Meckenheim, Deutschland  
 GFL, Burgwedel, Deutschland  
 Gibco BRL, Neu-Isenburg, Deutschland  
 GraphPad Software Inc., San Diego, USA  
 Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland  
 Heraeus, Hanau, Deutschland  
 Immunex, USA  
 Immuno GmbH, Heidelberg  
 Immunotech GmbH, Hamburg, Deutschland

---

Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland  
 Intelligenetics, Geel, Belgien  
 Landgraf, Hannover, Deutschland  
 MBI Fermentas Molecular Biology GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland  
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland  
 Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland  
 Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland  
 MWG-Biotech Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH, Ebersberg, Deutschland  
 Nalgene, Rochester, USA  
 New England Biolabs  
 Niles & Associates Inc., Berkeley, USA  
 PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland  
 PeproTech über Tebu GmbH, Frankfurt/M., Deutschland  
 Pharmacia, Freiburg, Deutschland  
 PharMingen GmbH, Hamburg, Deutschland  
 Promega, Deutschland  
 Ridel-de Haën AG, Seelze, Deutschland  
 Qiagen, Hilden, Deutschland  
 Roth, Karlsruhe, Deutschland  
 Sarstedt, Deutschland  
 Savant Instruments, Farmingdale, USA  
 SCI Science Services GmbH, München, Deutschland  
 Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan  
 Serva, Heidelberg, Deutschland  
 Sigma, Deisenhofen, Deutschland  
 Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland  
 Takara über Boehringer Ingelheim, Deutschland  
 USB United States Biochemical, Cleveland, USA  
 Wako, USA

---

## 7 Referenzen

- Abts, H., M. Emmerich, S. Miltenyi, A. Radbruch, and H. Tesch. 1989. CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. *J Immunol Methods* 125: 19-28.
- Antony, A. C. 1992. The biological chemistry of folate receptors. *Blood* 73: 284.
- Armstrong, C., J. Schubert, E. Ueda, J. J. Knez, D. Gelperin, S. Hirose, R. Silber, S. Hollan, R. E. Schmidt, and M. E. Medof. 1992. Affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria T lymphocytes harbor a common defect in assembly of N-acetyl-D-glucosamine inositol phospholipid corresponding to that in class A Thy-1- murine lymphoma mutants. *J Biol Chem* 267: 25347-51.
- Ausubel, A. M., R. Brent, R. E. Kingston, J. A. Smith, J. G. Seidmann, and D. Struhl. 1991. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Bacigalupo, A., J. Hows, E. Gluckman, C. Nissen, J. Marsh, M. T. Van Lint, M. Congiu, M. M. De Planque, P. Ernst, S. McCann, A. Raghavachar, N. Frickhofen, A. Wursch, A. M. Marmont, and E. C. Gordon-Smith. 1988. Bone marrow transplantation (BMT) versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anemia (SAA): A report of the EBMT SAA Working Party. *Br J Haematol* 70: 177-182.
- Baum, C., H. G. Eckert, C. Stocking, and W. Ostertag. 1996. Activity of Friend mink cell focus-forming retrovirus during myelo- erythroid hematopoiesis. *Exp Hematol* 24: 364-70.
- Baum, C., S. Hegewisch-Becker, H. G. Eckert, C. Stocking, and W. Ostertag. 1995. Novel retroviral vectors for efficient expression of the multidrug resistance (mdr-1) gene in early hematopoietic cells. *J Virol* 69: 7541-7.
- Beck, W. S., and W. N. Valentine. 1951. Biochemical studies on leucocytes. II. Phosphatase activity in chronic lymphatic leukemia and miscellaneous hematologic conditions. *J Lab Clin Med* 38: 245.
- Bessler, M., and P. Hillmen. 1998. Somatic mutation and clonal selection in the pathogenesis and in the control of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Semin Hematol* 35: 149-67.
- Bessler, M., P. Mason, P. Hillmen, and L. Luzzatto. 1994a. Somatic mutations and cellular selection in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 343: 951-3.
- Bessler, M., P. J. Mason, P. Hillmen, T. Miyata, N. Yamada, J. Takeda, L. Luzzatto, and T. Kinoshita. 1994b. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) is caused by somatic mutations in the *PIG-A* gene. *EMBO J* 13: 110-7.

- 
- Bobolis, K. A., J. J. Moulds, and M. J. Telen. 1992. Isolation of the JMH antigen on a novel phosphatidylinositol-linked human membrane protein. *Blood* 79: 1574-81.
- Borge, O. J., V. Ramsfjell, L. Cui, and S. E. W. Jacobsen. 1997. Ability of early acting cytokines to directly promote survival and suppress apoptosis of human primitive CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> bone marrow cells with multilineage potential at the single-cell level: key role of thrombopoietin. *Blood* 90: 2282-2292.
- Bosselman, R. A., R. Y. Hsu, J. Bruszewski, S. Hu, F. Martin, and M. Nicolson. 1987. Replication-defective chimeric helper proviruses and factors affecting generation of competent virus: expression of moloney murine leukemia virus structural genes via the metallöthionein promoter. *Mol Cell Biol* 7: 1797-1806.
- Bourantas, K. 1994. High-dose recombinant human erythropoietin and low-dose corticosteroids for treatment of anemia in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Acta Haematol* 91: 62-5.
- Boyer, H. W., and D. Roulland-Dussoix. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in Escherichia coli. *J Mol Biol* 41: 459-72.
- Braun Breton, C., T. L. Rosenberry, and L. P. da Silva. 1988. Induction of the proteolytic activity of a membrane protein in Plasmodium falciparum by phosphatidyl inositol-specific phospholipase C. *Nature* 332: 457-9.
- Bregni, M., M. Di Nicola, S. Siena, N. Belli, M. Milanesi, S. Shammah, F. Ravagnani, and A. M. Gianni. 1998. Mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells express more amphotropic rtrovirus receptor than bone marrow CD34<sup>+</sup> cells. *Haematologica* 83: 204-208.
- Brodsky, R. A., M. S. Vala, J. P. Barber, M. E. Medof, and R. J. Jones. 1997. Resistance to apoptosis caused by PIG-A gene mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 8756-60.
- Cashman, J. D., T. Lapidot, J. C. Y. Wang, M. Doedens, L. D. Shultz, D. Lansdorp, J. E. Dick, and C. J. Eaves. 1997. Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal bone marrow transplanted into immunodeficient mice. *Blood* 89: 4307-4316.
- Challita, P. M., and D. B. Kohn. 1994. Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2567-71.
- Chen, T. R. 1988. Re-evaluation of HeLa, HeLa S3, and HEp-2 karyotypes. *Cytogenet Cell Genet* 48: 19-24.
- Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller. 1989. One-step preparation of competent E. coli: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2172.

- 
- Conneally, E., C. J. Eaves, and R. K. Humphries. 1998. Efficient retroviral-mediated gene transfer to human cord blood stem cells with in vivo repopulating potential. *Blood* 91: 3487-3493.
- Cornetta, K., and W. F. Anderson. 1989. Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. *J Virol Methods* 23: 187-194.
- Costello, L. C., and P. Orlean. 1992. Inositol acylation of a potential glycosyl phosphoinositol anchor precursor from yeast requires acyl coenzyme A. *J Biol Chem* 267: 8599-603.
- Cotton, R. G. H., and C. R. Scriver. 1998. Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat* 12: 1-3.
- Coutinho, L. H., A. Will, J. Radford, R. Schiró, N. G. Testa, and T. M. Dexter. 1990. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (CSF), human granulocyte macrophage-CSF and gibbon interleukin-3 on hematopoiesis in human long-term bone marrow culture. *Blood* 75: 2118.
- Crooks, G. M., and D. B. Kohn. 1993. Growth factors increase amphotropic retrovirus binding to human CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitor cells. *Blood* 82: 3290-3297.
- Dameshek, W. 1969. Foreword and a proposal for considering paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) as a candidate myeloproliferative disorder. *Blood* 33: 263-264.
- Dao, M. A., C. H. Hannum, D. B. Kohn, and J. A. Nolta. 1997a. FLT3 ligand preserves the ability of human CD34<sup>+</sup> progenitors to sustain long-term hematopoiesis in immune-deficient mice after ex vivo retroviral-mediated transduction. *Blood* 89: 446-56.
- Dao, M. A., X. J. Yu, and J. A. Nolta. 1997b. Clonal diversity of primitive human hematopoietic progenitors following retroviral marking and long-term engraftment in immune-deficient mice. *Exp Hematol* 25: 1357-66.
- Das, S., A. Traynor Kaplan, D. S. Reiner, T. C. Meng, and F. D. Gillin. 1991. A surface antigen of *Giardia lamblia* with a glycosylphosphatidylinositol anchor [published erratum appears in *J Biol Chem* 1991 Dec 5;266(34):23516]. *J Biol Chem* 266: 21318-25.
- Davitz, M. A., M. G. Low, and V. Nussenzweig. 1986. Release of decay-accelerating factor (DAF) from the cell membrane by phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC). Selective modification of a complement regulatory protein. *J Exp Med* 163: 1150-61.
- De Planque, M. M., A. Bacigalupo, A. Wursch, J. M. Hows, A. Devergie, N. Frickhofen, A. Brand, and C. Nissen. 1989. Long-term follow-up of severe aplastic anemia patients treated with anti-thymocyte globulin. Severe Aplastic Anemia Working Party of the

- 
- European Cooperative Group for Bone Marrow Transplantation. *Br J Haematol* 73: 121.
- Deregnaucort, C., A. Keller, and Y. Capdeville. 1988. A new class of paramecium surface proteins anchored in the plasma membrane by a glycosylinositol phospholipid. *Biochem J* 253: 395.
- Devine, D. V., W. L. Gluck, W. F. Rosse, and J. B. Weinberg. 1987. Acute myeloblastic leukemia in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Evidence of evolution from the abnormal paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone. *J Clin Invest* 79: 314-7.
- Doering, T. L., W. J. Masterson, P. T. Englund, and G. W. Hart. 1989. Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the non-acetylated glucosamine. *J Biol Chem* 264: 11168-73.
- Du, X. X., and D. A. Williams. 1994. Interleukin-11: a multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenvironment. *Blood* 83: 2023-2030.
- Early, A. E., J. G. Williams, H. E. Meyer, S. B. Por, E. Smith, K. L. Williams, and A. A. Gooley. 1988. Structural characterization of Dictyostelium discoideum prespore-specific gene D19 and of its product, cell surface glycoprotein PsA. *Mol Cell Biol* 8: 3458-66.
- Eckert, H. G., M. Stockschrader, U. Just, S. Hegewisch-Becker, M. Grez, A. Uhde, A. Zander, W. Ostertag, and C. Baum. 1996. High-dose multidrug resistance in primary human hematopoietic progenitor cells transduced with optimized retroviral vectors. *Blood* 88: 3407-15.
- Eliason, J. F., B. Thorens, V. Kindler, and P. Vassalli. 1988. The roles of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 in stromal cell mediated hemopoiesis in vivo. *Exp Hematol* 16: 307.
- Emerson, S. G. 1996. Ex vivo expansion of hematopoietic precursors, progenitors, and stem cells: the next generation of cellular therapeutics. *Blood* 87: 3082-3088.
- Endo, M., P. G. Beatty, T. M. Vreeke, C. T. Wittwer, S. P. Singh, and C. J. Parker. 1996a. Syngeneic bone marrow transplantation without conditioning in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: in vivo evidence that the mutant stem cells have a survival advantage. *Blood* 88: 742-50.
- Endo, M., R. E. Ware, T. M. Vreeke, S. P. Singh, T. A. Howard, A. Tomita, M. H. Holguin, and C. J. Parker. 1996b. Molecular basis of the heterogeneity of expression of glycosyl phosphatidylinositol anchored proteins in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87: 2546-57.
- Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu Rev Biochem* 62: 121-38.

- 
- Flasshove, M., D. Banerjee, S. Mineishi, M. X. Li, J. R. Bertino, and M. A. Moore. 1995. Ex vivo expansion and selection of human CD34<sup>+</sup> peripheral blood progenitor cells after introduction of a mutated dihydrofolate reductase cDNA via retroviral gene transfer. *Blood* 85: 566-574.
- Forestell, S. P., E. Bohnlein, and R. J. Rigg. 1995. Retroviral end-point titer is not predictive of gene transfer efficiency: implications for vector production. *Gene Ther* 2: 723-30.
- Fournier, D., J. B. Berge, M. L. Cardoso de Almeida, and C. Bordier. 1988. Acetylcholinesterases from *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* brain are linked to membranes by a glycosphospholipid anchor sensitive to an endogenous phospholipase. *J Neurochem* 50: 1158-63.
- Fujioka, S., and T. Takayoshi. 1989. Prognostic features of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. *Acta Haematol JPN* 52: 1386-1394.
- Gabbianelli, M., E. Pelosi, E. Montesoro, M. Valtieri, L. Luchetti, P. Samoggia, L. Vitelli, T. Barberi, U. Testa, S. Lyman, and C. Peschle. 1995. Multi-level effects of flt3 Ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood* 86: 1661-1670.
- Gasson, J. C. 1991. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 77: 1131-1145.
- Gillis, S., and J. Watson. 1980. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 152: 1709-19.
- Graham, M. L., W. F. Rosse, E. C. Halperin, C. R. Miller, and R. E. Ware. 1996. Resolution of Budd-Chiari syndrome following bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 92: 707-710.
- Griscelli Bennaceur, A., E. Gluckman, M. L. Scrobohaci, P. Jonveaux, T. Vu, A. Bazarbachi, E. D. Carosella, F. Sigaux, and G. Socie. 1995. Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: search for a pathogenetic link. *Blood* 85: 1354-63.
- Günzburg, W. H., and B. Salmons. 1997. *Gentransfer in Säugetierzellen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Ham, T. H. 1937. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: study of the mechanism of hemolysis in relation to acid-base equilibrium. *N Engl J Med* 217: 915.
- Hanenberg, H., X. L. Xiao, D. Dilloo, K. Hashino, I. Kato, and D. A. Williams. 1996. Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* 2: 876-82.

- 
- Hänsch, G. M., C. Hammer, R. Jiji, U. Rother, and M. L. Shin. 1983. Lysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes by acid-activated serum. *Immunobiol* 164: 118.
- Hänsch, G. M., S. Schonermack, and D. Roelcke. 1987. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria type III. Lack of an erythrocyte membrane protein restricting the lysis by C5b-9. *J Clin Invest* 80: 7-12.
- Hao, Q., A. J. Shah, F. T. Thiemann, E. M. Smogorzewska, and G. M. Crooks. 1995. A functional comparison of CD34+CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 86: 3745.
- Hassan, H. T., and A. Zander. 1996. Stem cell factor as a survival and growth factor in normal and malignant hematopoiesis. *Acta Haematol* 95: 257-262.
- Hattori, H., T. Machii, E. Ueda, M. Shibano, T. Kageyama, and T. Kitani. 1997. Increased frequency of somatic mutations at glycophorin A loci in patients with aplastic anaemia, myelodysplastic syndrome and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 98: 384-91.
- Hertenstein, B., B. Wagner, D. Bunjes, C. Duncker, A. Raghavachar, R. Arnold, H. Heimpel, and H. Schrezenmeier. 1995. Emergence of CD52-, phosphatidylinositolglycan-anchor-deficient T lymphocytes after in vivo application of Campath-1H for refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 86: 1487-92.
- Hillmen, P., S. M. Lewis, M. Bessler, L. Luzzatto, and J. V. Dacie. 1995. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 333: 1253-8.
- Hiroi, Y., I. Komuro, R. Chen, T. Hosoda, T. Mizuno, S. Kudoh, S. P. Georgescu, M. E. Medof, and Y. Yazaki. 1998. Molecular cloning of human homolog of yeast GAA1 which is required for attachment of glycosylphosphatidylinositols to proteins. *FEBS Lett* 421: 252-258.
- Hirose, S., R. P. Mohny, S. C. Mutka, L. Ravi, D. R. Singleton, G. Perry, A. M. Tartakoff, and M. E. Medof. 1992. Derivation and characterization of glycoinositol-phospholipid anchor-defective human K562 cell clones. *J Biol Chem* 267: 5272-8.
- Hirose, S., L. Ravi, S. V. Hazra, and M. E. Medof. 1991. Assembly and deacetylation of N-acetylglucosaminyl-plasmanylinositol in normal and affected paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3762-6.
- Holguin, M. H., L. R. Fredrick, N. J. Bernshaw, L. A. Wilcox, and C. J. Parker. 1989a. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 84: 7-17.
- Holguin, M. H., L. A. Wilcox, N. J. Bernshaw, W. F. Rosse, and C. J. Parker. 1989b. Relationship between the membrane inhibitor of reactive lysis and the erythrocyte phenotypes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 84: 1387-94.



- 
- Horikawa, K., H. Nakakuma, T. Kawaguchi, N. Iwamoto, S. Nagakura, T. Kagimoto, and K. Takatsuki. 1997. Apoptosis resistance of blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, and myelodysplastic syndrome. *Blood* 90: 2716-22.
- Ikezawa, H., M. Yamanegi, R. Taguchi, T. Miyashita, and T. Ohyabu. 1976. Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Bacillus cereus*. I. Purification, properties and phosphatase-releasing activity. *Biochim Biophys acta* 450: 154-164.
- Inoue, N., T. Kinoshita, T. Orii, and J. Takeda. 1993. Cloning of a human gene, *PIG-F*, a component of glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis, by a novel expression cloning strategy. *J Biol Chem* 268: 6882-5.
- Inoue, N., R. Watanabe, J. Takeda, and T. Kinoshita. 1996. *PIG-C*, one of the three human genes involved in the first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is a homologue of *Saccharomyces cerevisiae GPI2*. *Biochem Biophys Res Commun* 226: 193-9.
- Iwamoto, N., T. Kawaguchi, K. Horikawa, S. Nagakura, T. Kagimoto, T. Suda, K. Takatsuki, and H. Nakakuma. 1996. Preferential hematopoiesis by paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone engrafted in SCID mice. *Blood* 87: 4944-8.
- Jainchill, J. L., S. A. Aaronson, and G. J. Todaro. 1969. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 4: 549-53.
- Jost, C. R., M. L. Gaillard, J. A. Fransen, M. R. Daha, and L. A. Ginsel. 1991. Intracellular localization of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored CD67 and FcRIII (CD16) in affected neutrophil granulocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 78: 3030-6.
- Josten, K. M., J. A. Tooze, C. Borthwick Clarke, E. C. Gordon Smith, and T. R. Rutherford. 1991. Acquired aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: studies on clonality. *Blood* 78: 3162-7.
- Kamitani, T., H. M. Chang, C. Rollins, G. L. Waneck, and E. T. Yeh. 1993. Correction of the class H defect in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in Ltk- cells by a human cDNA clone. *J Biol Chem* 268: 20733-6.
- Kavanaugh, M. P., D. G. Miller, W. Zhang, W. Law, S. L. Kozak, D. Kabat, and A. D. Miller. 1994. Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7071-7075.
- Kawagoe, K., D. Kitamura, M. Okabe, I. Taniuchi, M. Ikawa, T. Watanabe, T. Kinoshita, and J. Takeda. 1996. Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87: 3600-6.

- 
- Kawahara, K., R. P. Witherspoon, and R. Storb. 1992. Marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 39: 283-8.
- Kiem, H. P., S. Heyward, A. Winkler, J. Potter, J. M. Allen, A. D. Miller, and R. G. Andrews. 1997. Gene transfer into marrow repopulating cells: comparison between amphotropic and gibbon ape leukemia virus pseudotyped retroviral vectors in a competitive repopulation assay in baboons. *Blood* 90: 4638-45.
- Kim, C. H., and H. E. Broxmeyer. 1998. In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood* 91: 100-110.
- Koller, M. R., J. G. Bender, E. T. Papoutsakis, and W. M. Miller. 1992. Effects of synergistic cytokine combinations, low oxygen, and irradiated stroma on the expansion of human cord blood progenitors. *Blood* 80: 403-411.
- Kunstling, T. R., and W. F. Rosse. 1969. Erythrocyte acetylcholinesterase in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). A comparison of the complement sensitive and insensitive populations. *Blood* 33: 607.
- Langlois, R. G., W. L. Bigbee, and R. H. Jensen. 1986. Measurements of the frequency of human erythrocytes with gene expression loss phenotypes at the glycophorin A locus. *Hum Genet* 74: 353-362.
- Lapidot, T., Y. Fajerman, and O. Kollet. 1997. Immune-deficient SCID and NOD/SCID mice models as functional assays for studying normal and malignant human hematopoiesis. *J Mol Med* 75.
- Leary, A. G., K. Ikebuchi, Y. Hirai, G. G. Wong, Y.-C. Yang, S. C. Clark, and M. Ogawa. 1988. Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: Comparison with interleukin-1 $\alpha$ . *Blood* 71: 1759.
- Low, M. G., and J. B. Finean. 1977. Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem J* 167: 281-4.
- Low, M. G., and P. W. Kincade. 1985. Phosphatidylinositol is the membrane-anchoring domain of the Thy-1 glycoprotein. *Nature* 318: 62-64.
- Luzzatto, L., M. Bessler, and B. Rotoli. 1997. Somatic mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a blessing in disguise? *Cell* 88: 1-4.
- Lyman, S. D., L. James, T. V. Bos, P. de Vries, K. Brasel, B. Gliniak, L. T. Hollingsworth, K. Picha, H. J. McKenna, R. R. Splett, F. A. Fletcher, E. Maraskovsky, T. Farrah, D. Foxworthe, D. E. Williams, and M. P. Beckmann. 1993. Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 75: 1157-1167.

- 
- Maciejewski, J. P., C. Selleri, T. Sato, S. Anderson, and N. S. Young. 1995. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34<sup>+</sup> cells of patients with aplastic anemia. *Br J Haematol* 91: 245.
- Maciejewski, J. P., E. M. Sloand, T. Sato, S. Anderson, and N. S. Young. 1997. Impaired hematopoiesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria/aplastic anemia is not associated with a selective proliferative defect in the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein-deficient clone. *Blood* 89: 1173-81.
- Maeda, Y., S. Tomita, R. Watanabe, K. Ohishi, and T. Kinoshita. 1998. DPM2 regulates biosynthesis of dolichol phosphate-mannose in mammalian cells: correct subcellular localization and stabilization of DPM1, and binding of dolichol phosphate. *Embo J* 17: 4920-4929.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Markowitz, D., S. Goff, and A. Bank. 1988a. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology* 167: 400-406.
- Markowitz, D., S. Goff, and A. Bank. 1988b. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J Virol* 62: 1120-1124.
- Marsh, J. C., C. W.J., and N. G. Testa. 1990. The hematopoietic defect in aplastic anemia assessed by long-term marrow culture. *Blood* 67: 1748-1757.
- Mayne, K. M., K. Pulford, M. Jones, K. Micklem, G. Nagel, C. E. van der Schoot, and D. Y. Mason. 1993. Antibody By114 is selective for the 90kD PI-linked component of the CD66 antigen: a new reagent for the study of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Br J Haematol* 83: 30.
- McConville, M. J., and M. A. Ferguson. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *Biochem J* 294: 305-24.
- McCune, J. M., R. Namikawa, H. Kaneshima, L. D. Shultz, M. Lieberman, and I. L. Weissman. 1988. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241: 1632-1639.
- McKenna, H., P. deVries, K. Brasel, S. D. Lyman, and D. E. Williams. 1995. Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells. *Blood* 86: 3413-3420.
- Miller, A. D., and C. Buttimore. 1986. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 6: 2895-2902.
- Miller, A. D., J. V. Garcia, N. von Suhr, C. M. Lynch, C. Wilson, and M. V. Eiden. 1991. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65: 2220-2224.

- 
- Miller, A. D., and G. J. Rosman. 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *BioTechniques* 7: 980-990.
- Miller, D. G., M. A. Adam, and A. D. Miller. 1990. Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* 10: 4239-4242.
- Misumi, Y., S. Ogata, K. Ohkubo, S. Hirose, and Y. Ikehara. 1990. Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *Eur J Biochem* 181: 563.
- Miyata, T., J. Takeda, Y. Iida, N. Yamada, N. Inoue, M. Takahashi, K. Maeda, T. Kitani, and T. Kinoshita. 1993. The cloning of *PIG-A*, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 259: 1318-20.
- Moore, K. A., A. B. Deisseroth, C. L. Reading, D. E. Williams, and J. W. Belmont. 1992. Stromal support enhances cell-free retroviral vector transduction of human bone marrow long-term culture-initiating cells. *Blood* 79: 1393-9.
- Moritz, T., P. Dutt, X. Xiao, D. Carstanjen, T. Vik, H. Hanenberg, and D. A. Williams. 1996. Fibronectin improves transduction of reconstituting hematopoietic stem cells by retroviral vectors: evidence of direct viral binding to chymotryptic carboxy-terminal fragments. *Blood* 88: 855-62.
- Moritz, T., V. P. Patel, and D. A. Williams. 1994. Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors. *J Clin Invest* 93: 1451.
- Nagakura, S., T. Kawaguchi, K. Horikawa, M. Hidaka, N. Iwamoto, K. Takatsuki, H. Nakakuma, and T. Kagimoto. 1993. A deficiency in CDw52 (CAMPATH-1 antigen) of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria lymphocytes [letter]. *Blood* 82: 3790-2.
- Nakamura, N., N. Inoue, R. Watanabe, M. Takahashi, J. Takeda, V. L. Stevens, and T. Kinoshita. 1997. Expression cloning of *PIG-L*, a candidate *N*-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol deacetylase. *J Biol Chem* 272: 15834-40.
- Nakao, S., M. Yamaguchi, H. Takamatsu, S. Shiobara, and T. Matusda. 1992. Expansion of a paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) clone after cyclosporine therapy for aplastic anemia/PNH syndrome [letter; comment]. *Blood* 80: 2943-4.
- Nicholson-Weller, A., J. P. March, S. I. Rosenfeld, and K. F. Austen. 1983. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5066-5070.
- Nimgaonkar, M. T., A. B. Bahnson, S. S. Boggs, E. D. Ball, and J. A. Barranger. 1994. Transduction of mobilized peripheral blood CD34+ cells with the glucocerebrosidase cDNA. *Gene Ther* 1: 201-7.

- Ninomiya, H., Y. Muraki, K. Shibuya, T. Nagasawa, and T. Abe. 1993. Induction of Fc gamma R-III (CD16) expression on neutrophils affected by paroxysmal nocturnal haemoglobinuria by administration of granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 84: 497-503.
- Nischan, C. 1998. Expression und Charakterisierung des Phosphatidylinositolglycan-A-Proteins. Universität Hannover, Hannover.
- Nishimura, J. I., N. Inoue, Y. Azenishi, T. Hirota, T. Akaogi, M. Shibano, K. Kawagoe, E. Ueda, T. Machii, J. Takeda, T. Kinoshita, and T. Kitani. 1996. Analysis of PIG-A gene in a patient who developed reciprocal translocation of chromosome 12 and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria during follow-up of aplastic anemia. *Am J Hematol* 51: 229-33.
- Ohishi, K., N. Katayama, N. Itoh, N. Mahmud, H. Miwa, K. Kita, N. Minami, S. Shirakawa, S. D. Lyman, and H. Shiku. 1996. Accelerated cell cycling of hematopoietic progenitors by the *flt3* ligand that is modulated by transforming growth factor- $\beta$ . *Blood* 87: 1718-1727.
- Oni, S. B., B. O. Osunkoya, and L. Luzzatto. 1970. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: evidence for monoclonal origin of abnormal red cells. *Blood* 36: 145-152.
- Ostendorf, T. 1995. Die molekulargenetische Charakterisierung des Glycosylphosphatidylinositol-Verankerungsdefektes in der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie. Pages 98. Universität Hannover, Hannover.
- Ostendorf, T., C. Nischan, J. Schubert, T. Grussenmeyer, C. Scholz, M. Zielinska-Skowronek, and R. E. Schmidt. 1995. Heterogeneous *PIG-A* mutations in different cell lineages in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 85: 1640-6.
- Pangburn, M. K., R. D. Shreiber, and H. J. Müller-Eberhard. 1983. Deficiency of an erythrocyte membrane protein with complement regulatory activity in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5430-5434.
- Paquette, R. L., R. Yoshimura, C. Veiseth, L. Kunkel, J. Gajewski, and P. J. Rosen. 1997. Clinical characteristics predict response to antithymocyte globulin in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 96: 92-7.
- Paul, R. W., D. Morris, B. W. Hess, J. Dunn, and R. W. Overell. 1993. Increased viral titer through concentration of viral harvests from retroviral packaging lines. *Hum Gene Ther* 4: 609-15.
- Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott, and D. Baltimore. 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8392-8396.
- Ploug, M., T. Plesner, E. Ronne, V. Ellis, G. Hoyer Hansen, N. E. Hansen, and K. Dano. 1992. The receptor for urokinase-type plasminogen activator is deficient on peripheral

- blood leukocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 79: 1447-55.
- Porter, C. D., M. H. Parkar, M. K. Collins, R. J. Levinsky, and C. Kinnon. 1996. Efficient retroviral transduction of human bone marrow progenitor and long-term culture-initiating cells: partial reconstitution of cells from patients with X-linked chronic granulomatous disease by gp91-phox expression. *Blood* 87: 3722-30.
- Pramoonjago, P., W. Wanachiwanawin, S. Chinprasertsak, K. Pattanapanayasat, J. Takeda, and T. Kinoshita. 1995. Somatic mutations of *PIG-A* in Thai patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 86: 1736-9.
- Presky, D. H., M. G. Low, and E. M. Shevach. 1990. Role of phosphatidylinositol-anchored proteins in T-cell activation. *J Immunol* 144: 860-868.
- Puoti, A., and A. Conzelmann. 1993. Characterization of abnormal free glycoposphatidylinositols accumulating in mutant lymphoma cells of classes B, E, F, and H. *J Biol Chem* 268: 7215-24.
- Rosenberg, S. A., P. Aebersold, K. Cornetta, A. Kasid, R. A. Morgan, R. Moen, E. M. Karson, M. T. Lotze, J. C. Yang, S. L. Topalian, and et al. 1990. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction [see comments]. *N Engl J Med* 323: 570-8.
- Rosse, W. F. 1990. Phosphatidylinositol-linked proteins and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 75: 1595-601.
- Rosse, W. F., and J. V. Dacie. 1966a. Immune lysis of normal and paroxysmal nocturnal hemoglobinurie (PNH) red blood cells. I. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest* 45: 736-748.
- Rosse, W. F., and J. V. Dacie. 1966b. Immune lysis of normal and paroxysmal nocturnal hemoglobinurie (PNH) red blood cells. II. The role of complement components in the increased sensitivity of PNH red cells to immune lysis. *J Clin Invest* 45: 749.
- Rosti, V., G. Tremml, V. Soares, P. P. Pandolfi, L. Luzzatto, and M. Bessler. 1997. Murine embryonic stem cells without pig-a gene activity are competent for hematopoiesis with the PNH phenotype but not for clonal expansion [see comments]. *J Clin Invest* 100: 1028-36.
- Rotoli, B., R. Robledo, and L. Luzzatto. 1982. Decreased number of circulating BFU-Es in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 60: 157-159.
- Rusten, L. S., S. D. Lyman, O. P. Veiby, and S. E. W. Jacobsen. 1996. The FLT3 ligand is a direct and potent stimulator of primitive and committed human CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitor cells in vitro. *Blood* 87: 1317-1325.

- 
- Sabatino, D. E., B. Q. Do, L. C. Pyle, N. E. Seidel, L. J. Girard, S. K. Spratt, D. Orlic, and D. M. Bodine. 1997. Amphotropic or gibbon ape leukemia virus retrovirus binding and transduction correlates with the level of receptor mRNA in human hematopoietic cell lines. *Blood Cells Mol Dis* 23: 422-433.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual, second edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Savoia, A., L. Ianzano, C. Lunardi, G. De Sandre, M. Carotenuto, P. Musto, and L. Zelante. 1996. Identification of three novel mutations in the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) patients. *Hum Genet* 97: 45-8.
- Schilz, A. J., G. Brouns, H. Knöß, O. G. Ottmann, D. Hoelzer, A. A. Fauser, A. J. Thrasher, and M. Grez. 1998. High efficiency gene transfer to human hematopoietic SCID-repopulating cells under serum-free conditions. *Blood* 92: 3163-3171.
- Schrezenmeier, H., B. Hertenstein, B. Wagner, A. Raghavachar, and H. Heimpel. 1995. A pathogenetic link between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is suggested by a high frequency of aplastic anemia patients with a deficiency of phosphatidylinositol glycan anchored proteins. *Exp Hematol* 23: 81-7.
- Schrezenmeier, H., P. Marin, B. Wagner, and e. al. 1993. Relapse of aplastic anemia after immunosuppressive treatment: A report from the European Bone Marrow Transplantation Group SAA Working Party. *Br J Haematol* 85: 371-377.
- Schubert, J., M. Alvarado, P. Uciechowski, M. Zielinska-Skowronek, M. Freund, H. Vogt, and R. E. Schmidt. 1991. Diagnosis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using immunophenotyping of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 79: 487-92.
- Schubert, J., and R. E. Schmidt. 1992. Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie. Diagnostik mit fluoreszenz-aktivierter Zellanalyse. *Dtsch Med Wochenschr* 117: 985-9.
- Schubert, J., R. E. Schmidt, and M. E. Medof. 1993. Regulation of glycoinositol phospholipid anchor assembly in human lymphocytes. Absent mannosyl lipid synthesis in affected T and natural killer cell lines from paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients. *J Biol Chem* 268: 6281-7.
- Schubert, J., C. Scholz, R. G. Geissler, A. Ganser, and R. E. Schmidt. 1997. G-CSF and cyclosporin induce an increase of normal cells in hypoplastic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Hematol* 74: 225-30.
- Schubert, J., C. Scholz, and R. E. Schmidt. 1995. Experimentelle Therapie bei der hypoplastischen paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH). *Immun Infekt* 23: 65-6.
- Schubert, J., P. Uciechowski, M. Zielinska Skowronek, C. Tietjen, R. Leo, and R. E. Schmidt. 1992. Differences in activation of normal and glycosylphosphatidylinositol-

- negative lymphocytes derived from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Immunol* 148: 3814-9.
- Schubert, J., H. G. Vogt, M. Zielinska-Skowronek, M. Freund, J. P. Kaltwasser, D. Hoelzer, and R. E. Schmidt. 1994. Development of the glycosylphosphatidylinositol-anchoring defect characteristic for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in patients with aplastic anemia. *Blood* 83: 2323-8.
- Selvaraj, P., M. L. Dustin, R. Silber, M. G. Low, and T. A. Springer. 1987. Deficiency of lymphocyte function-associated antigen 3 (LFA-3) in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Functional correlates and evidence for a phosphatidylinositol membrane anchor. *J Exp Med* 166: 1011-25.
- Selvaraj, P., W. F. Rosse, R. Silber, and T. A. Springer. 1988. The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Nature* 333: 565.
- Shah, A. J., E. M. Smogorzewska, C. Hannum, and G. M. Crooks. 1996. Flt3 ligand induces proliferation of quiescent human bone marrow CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> cells and maintains progenitor cells in vitro. *Blood* 87: 3563-3570.
- Shivdasani, R. A., and S. H. Orkin. 1996. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 87: 4025-4039.
- Simmons, D. L., S. Tan, D. G. Tenen, A. Nicholson Weller, and B. Seed. 1989. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood* 73: 284-9.
- Sinclair, A. M., Y. P. Agrawal, E. Elbar, R. Agrawal, A. D. Ho, and F. Levine. 1997. Interaction of vesicular stomatitis virus-G pseudotyped retrovirus with CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup> CD38<sup>-</sup> hematopoietic progenitor cells. *Gene Ther* 4: 918-27.
- Slein, M. W., and G. F. Logan. 1960. Mechanism of action of the toxin of *Bacillus anthracis*. I. Effect in vivo on some blood serum components. *J Bacteriol* 80: 77.
- Slein, M. W., and G. F. Logan. 1962. Mechanism of action of the toxin of *Bacillus anthracis*. II. Alkaline phosphatasemia produced by cultured filtrates of various bacilli. *J Bacteriol* 83: 359.
- Slein, M. W., and G. F. Logan. 1963. Partial purification and properties of two phospholipases of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 85: 369.
- Slein, M. W., and G. F. Logan. 1965. Characterization of the phospholipase of *Bacillus cereus* and their effect on erythrocytes, bone and kidney cells. *J Bacteriol* 90: 69.
- Smith, J. W., C. P. Hayward, P. Horsewood, T. E. Warkentin, G. A. Denomme, and J. G. Kelton. 1995. Characterization and localization of the Gova/b alloantigens to the glycosylphosphatidylinositol-anchored protein CDw109 on human platelets. *Blood* 86: 2807-14.



- 
- Smith, T. K., D. K. Sharma, A. Crossman, A. Dix, J. S. Brimacombe, and M. A. Ferguson. 1997. Parasite and mammalian GPI biosynthetic pathways can be distinguished using synthetic substrate analogues. *Embo J* 16: 6667-75.
- Socie, G., M. Henry-Amar, and A. Bacigalupo. 1993. Malignent tumors after treatment of aplastic anemia. *N Engl J Med* 329: 1152-1157.
- Socie, G., J. Y. Mary, A. de Gramont, B. Rio, M. Leporrier, C. Rose, P. Heudier, H. Rochant, J. Y. Cahn, and E. Gluckman. 1996. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. French Society of Haematology. *Lancet* 348: 573-7.
- Sorrentino, B. P., S. J. Brandt, D. Bodine, M. M. Gottesmann, I. Pastan, A. Cline, and A. W. Nienhuis. 1992. Selection of drug resistant bone marrow cells in vivo after retroviral transfer of human MDR1. *Science* 257: 99-103.
- Stafford, H. A., S. Nagarajan, J. B. Weinberg, and M. E. Medof. 1995. PIG-A, DAF and proto-oncogene expression in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-associated acute myelogenous leukaemia blasts. *Br J Haematol* 89: 72-8.
- Staunton, D. E., R. C. Fisher, M. M. LeBeau, J. B. Lawrence, D. E. Barton, U. Francke, M. Dustin, and D. A. Thorley Lawson. 1989. Blast-1 possesses a glycosylphosphatidylinositol (GPI) membrane anchor, is related to LFA-3 and OX-45, and maps to chromosome 1q21-23. *J Exp Med* 169: 1087-99.
- Stebler, C., A. Tichelli, H. Dazzi, A. Gratwohl, C. Nissen, and B. Speck. 1990. High-dose recombinant human erythropoietin for treatment of anemia in myelodysplastic syndromes and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a pilot study. *Exp Hematol* 18: 1204-8.
- Stevens, V. L., and C. R. Raetz. 1991. Defective glycosyl phosphatidylinositol biosynthesis in extracts of three Thy-1 negative lymphoma cell mutants. *J Biol Chem* 266: 10039-42.
- Strübing, P. 1882. Paroxysmale Hämoglobinurie. *Dtsch Med Wochenschr* 8: 1.
- Sugiyama, E., R. DeGasperi, M. Urakaze, H. M. Chang, L. J. Thomas, R. Hyman, C. D. Warren, and E. T. Yeh. 1991. Identification of defects in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in the Thy-1 expression mutants. *J Biol Chem* 266: 12119-22.
- Taichmann, R. S., M. J. Reilly, and S. G. Emerson. 1996. Human osteoblasts support hematopoietic progenitor cells in *in vitro* bone marrow cultures. *Blood* 87: 518-524.
- Takahashi, M., N. Inoue, K. Ohishi, Y. Maeda, N. Nakamura, Y. Endo, T. Fujita, J. Takeda, and T. Kinoshita. 1996. PIG-B, a membrane protein of the endoplasmic reticulum with a large lumenal domain, is involved in transferring the third mannose of the GPI anchor. *Embo J* 15: 4254-61.

- 
- Takeda, J., T. Miyata, K. Kawagoe, Y. Iida, Y. Endo, T. Fujita, M. Takahashi, T. Kitani, and T. Kinoshita. 1993. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 73: 703-11.
- Terstappen, L. W. M. M., S. Huang, M. Safford, P. M. Landsdorp, and M. R. Loken. 1991. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single non lineage committed progenitor cells. *Blood* 77: 1218.
- Testa, N. G., and G. Molineux. 1993. *Haemopoiesis - A Practical Approach*. Oxford University Press, New York.
- Thiemann, F. T., K. A. Moore, E. M. Smogorzewska, I. R. Lemishka, and G. M. Crooks. 1998. The murine stromal line AFT024 acts specifically on human CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> progenitors to maintain primitive function and immunophenotype *in vitro*. *Exp Hematol* 26: 612-619.
- Thomas, L. J., R. DeGasperi, E. Sugiyama, H. M. Chang, P. J. Beck, P. Orlean, M. Urakaze, T. Kamitani, J. F. Sambrook, C. D. Warren, and et al. 1991. Functional analysis of T-cell mutants defective in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchor. Relative importance of glycosylphosphatidylinositol anchor versus N-linked glycosylation in T- cell activation. *J Biol Chem* 266: 23175-84.
- Tiede, A., I. Bastisch, J. Schubert, and R. E. Schmidt. 1998a. Biosynthesis of glycosylphosphatidylinositols in mammals and unicellular microbes. *eingereicht*.
- Tiede, A., J. Schubert, C. Nischan, I. Jensen, B. Westfall, C. H. Taron, P. Orlean, and R. E. Schmidt. 1998b. Human and mouse Gpi1p homologues restore glycosylphosphatidylinositol membrane anchor biosynthesis in yeast mutants. *Biochem J* 334: 609-616.
- Tomavo, S., R. T. Schwarz, and J. F. Dubremetz. 1989. Evidence for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Toxoplasma gondii* major surface antigens. *Mol Cell Biol* 9: 4576-80.
- Tomita, S., N. Inoue, Y. Maeda, K. Ohishi, J. Takeda, and T. Kinoshita. 1998. A homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Dpm1p is not sufficient for synthesis of dolichol-phosphate-mannose in mammalian cells. *J Biol Chem* 273: 9249-54.
- Uchida, N., D. He, A. M. Frier, M. Reitsma, D. Sasaki, C. B., and A. Tsukamoto. 1997. The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood* 89: 465-472.
- Urakaze, M., T. Kamitani, R. DeGasperi, E. Sugiyama, H. M. Chang, C. D. Warren, and E. T. Yeh. 1992. Identification of a missing link in glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis in mammalian cells. *J Biol Chem* 267: 6459-62.
- van den Berg, C. W., T. Cinek, M. B. Hallett, V. Horejsi, and B. P. Morgan. 1995. Exogenous glycosyl phosphatidylinositol-anchored CD59 associates with kinases in

- membrane clusters on U937 cells and becomes Ca(2+)-signaling competent. *J Cell Biol* 131: 669-77.
- van der Loo, J. C. M., X. Xiao, D. McMillin, K. Hashino, I. Kato, and D. A. Williams. 1998. VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. *J Clin Invest* 102: 1051-1061.
- van der Schoot, C. E., T. W. Huizinga, E. T. van 't Veer Korthof, R. Wijmans, J. Pinkster, and A. E. von dem Borne. 1990. Deficiency of glycosyl-phosphatidylinositol-linked membrane glycoproteins of leukocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, description of a new diagnostic cytofluorometric assay. *Blood* 76: 1853-9.
- van Kamp, H., G. W. van Imhoff, J. T. M. de Wolf, J. W. Smit, M. R. Halie, and E. Vellenga. 1995. The effect of cyclosporine on haematological parameters in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 89: 79-82.
- Ware, F. E., and M. A. Lehrman. 1996. Expression cloning of a novel suppressor of the Lec15 and Lec35 glycosylation mutations of Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 271: 13935-8.
- Ware, R. E., S. E. Hall, and W. F. Rosse. 1991. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. *N Engl J Med* 325: 991-6.
- Ware, R. E., J.-I. Nishimura, M. A. Moody, C. Smith, W. F. Rosse, and T. A. Howard. 1998. The PIG-A mutation and absence of glycosylphosphatidylinositol-linked proteins do not confer resistance to apoptosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 92: 2541-2550.
- Watanabe, R., N. Inoue, B. Westfall, C. H. Taron, P. Orlean, J. Takeda, and T. Kinoshita. 1998. The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. *Embo J* 17: 877-85.
- Weiss, A., R. L. Wiskocil, and J. D. Stobo. 1984. The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* 133: 123-8.
- Williams, D. A., M. Rios, C. Stephens, and V. Patel. 1991. Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell microenvironment interaction. *Nature* 352: 438.
- Wineman, J., K. Moore, I. Lemishka, and C. Müller-Sieburg. 1996. Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal Elements maintain long-term repopulating cells. *Blood* 87: 4082-4090.
- Xu, L.-X., S. Kluepfel-Stahl, M. Blanco, R. Schiffmann, C. Dunbar, and S. Karlsson. 1995. Growth factors and stromal support generate very efficient retroviral transduction of peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells from Gaucher patients. *Blood* 86: 141-146.

- 
- Yam, P. Y., J. K. Yee, J. I. Ito, I. Sniecinski, J. H. Doroshow, S. J. Forman, and J. A. Zaia. 1998. Comparison of amphotropic and pseudotyped VSV-G retroviral transduction in human CD34<sup>+</sup> peripheral blood progenitor cells from adult donors with HIV-1 infection or cancer. *Exp Hematol* 26: 962-968.
- Yamada, N., T. Miyata, K. Maeda, T. Kitani, J. Takeda, and T. Kinoshita. 1995. Somatic mutations of the *PIG-A* gene found in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 85: 885-92.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-19.
- Yokota, T., K. Oritani, H. Mitsui, K. Aoyama, J. Ishikawa, H. Sugahara, I. Matsumura, S. Tsai, Y. Tomiyama, Y. Kanakura, and Y. Matsuzawa. 1998. Growth-supporting activities of fibronectin on hematopoietic stem/progenitor cells in vitro and in vivo: structural requirement for fibronectin activities of CS1 and cell-binding domains. *Blood* 91: 3263-3272.
- Yonemura, Y., M. Kawakita, A. Koito, T. Kawaguchi, H. Nakakuma, T. Kagimoto, T. Shichishima, T. Terasawa, Y. Akagaki, S. Inai, and K. Takatsuki. 1990. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria with coexisting deficiency of the ninth component of complement lack of massive haemolytic attack. *Br J Haematol* 74: 108-113.
- Young, J. C., E. Bruno, K. M. Luens, S. Wu, M. Backer, and L. J. Murray. 1996. Thrombopoietin stimulates megakaryocytopoiesis, myelopoiesis, and expansion of CD34<sup>+</sup> progenitor cells from single CD34<sup>+</sup>Thy-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> primitive progenitor cells. *Blood* 88: 1619.
- Young, N. S. 1992. The problem of clonality in aplastic anemia: Dr. Dameshek's riddle, restated. *Blood* 79: 1385-92.
- Yu, J., S. Nagarajan, J. J. Knez, S. Udenfriend, R. Chen, and M. E. Medof. 1997. The affected gene underlying the class K glycosylphosphatidylinositol (GPI) surface protein defect codes for the GPI transamidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12580-5.
- Yu, J., S. Nagarajan, E. Ueda, J. J. Knez, R. B. Petersen, and M. E. Medof. 1994. Characterization of alternatively spliced PIG-A transcripts in normal and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *Braz J Med Biol Res* 27: 195-201.
- Zalman, L. S., L. M. Wood, M. M. Frank, and H. J. Müller-Eberhard. 1987. Deficiency of the homologous restriction factor in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 165: 572.

## 8 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt, danke ich für seine Betreuung, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen und für die Unterstützung, die mir in allen Phasen der Arbeit zuteil geworden ist.

Herrn Dr. Jörg Schubert danke ich für die wissenschaftliche Betreuung, dafür, daß er der Arbeit einen konzeptionellen Rahmen verliehen hat und für die zahlreichen Diskussionen, ohne die diese Arbeit so nie zustande gekommen wäre.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther danke ich für die Übernahme des Koreferates und die 'molekulare' Kobetreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs, die dieser Arbeit etwas mehr Geradlinigkeit verliehen hat.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Jörg Schmidtke für die humangenetische Sichtweise, die er als mein Kobetreuer in die Arbeit einbrachte, und für die vielfältigen Hilfen, die er mir angeboten hat.

PD Dr. Bernhard Lüscher wie auch den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe danke ich für die zahlreichen Hilfestellungen und Diskussionen, die mich vor viel unnötiger Arbeit bewahrt haben.

Mein ganz besonderer Dank ist an alle Mitarbeiter, ehemalige und jetzige, der Abteilung Klinische Immunologie gerichtet, die alle auf irgendeine Art einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben. Dr. (so viel Zeit muß sein) Claudia Nischan danke ich für die phantastische Zusammenarbeit, für die vielen Diskussionen und die gute Atmosphäre, die sich auch in etlichen Unternehmungen in der Freizeit niedergeschlagen hat. Claudia Scholz und Gisela Wichers danke ich für die Geduld, die sie bei meiner Einarbeitung bewiesen haben - ich habe viel gelernt. Dr. Roland Jacobs danke ich für zahlreiche fachliche und nicht ganz so fachliche Gespräche und dafür, daß er diese Arbeit so bereitwillig Korrektur gelesen hat. Anja Ziolk möchte ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung danken. Andreas Tiede danke ich für die vielen Diskussionen und die medizinische Sichtweise, die er in diesen Diskussionen einbrachte. Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern aus Labor 5 und dem Medienraum bzw. 'von drüben', Anu, Astrid, Bettina, Carsten, Dirk, Engelbert, Esther, Frank, Georg, Gundula, Gyn, Iska, Karsten, Margot,

---

Regine, Simone, Sonja, Thorsten und Uli für ihre Unterstützung, fruchtbare Diskussionen und nicht zuletzt wegen vieler TGIFs.

Darüber hinaus bin ich allen Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie zu Dank für die Beantwortung meiner vielen Fragen, die Erfüllung meiner Bitten und das unendliche Autoklavieren verpflichtet.

Ich danke meiner Familie, die mir überhaupt erst die Möglichkeit gab, dieses Studium durchzuführen. Im besonderen danke ich meiner Frau Birgit für ihre Unterstützung, das Ertragen meiner Hochs und Tiefs, dafür, daß ich mich monatelang um nichts zu kümmern brauchte, für die zahlreichen Korrekturen und dafür, daß sie mich in schwierigen Phasen immer wieder motivierte. Ich werde mich revanchieren.

Ich bedanke mich für das Stipendium, das ich über das Graduiertenkolleg "Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums" erhalten habe. In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern und Betreuern für Gespräche und Diskussionen bedanken.

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen des BMBF Gentherapieprogramms (BMBF 01GE9616) finanziert.

## 9 Lebenslauf

|                     |                 |
|---------------------|-----------------|
| Name                | Ingo Bastisch   |
| Geburtsdatum        | 29. Januar 1965 |
| Geburtsort          | Wiesbaden       |
| Familienstand       | verheiratet     |
| Staatsangehörigkeit | deutsch         |

### Schulbildung

|             |  |
|-------------|--|
| 1971 - 1975 | Grundschule Hermann-Ehlers-Schule, Wiesbaden |
| 1975 - 1976 | Gymnasium Gutenbergschule, Wiesbaden         |
| 1976 - 1984 | Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Köln      |

### Hochschulbildung

|                    |   |
|--------------------|---|
| 1986 - 1992        | Biologiestudium an der Universität zu Köln mit den Schwerpunkten Genetik, Entwicklungsbiologie, Informatik und Pharmakologie  |
| 1991 - 1992        | Diplomarbeit am Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Centro de Investigacion y Desarrollo, Departamento Genetica Molecular, Barcelona, Spanien, zum Thema: "Deletionsanalyse eines <i>O</i> -Methyltransferasegenpromotors von <i>Zea mays</i> "                                    |
| November 1992      | Diplom an der Universität zu Köln   |
| seit Dezember 1995 | Doktorarbeit an der medizinischen Hochschule Hannover, Zentrum Innere Medizin und Dermatologie, Abteilung Klinische Immunologie zum Thema " <i>PIG-A</i> Gentransfer in GPI-defiziente Knochenmarkstammzellen" im Rahmen des Graduiertenkollegs "Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums" |

### Originalpublikationen

Capellades, M. A. Torres, I. Bastisch, V. Stiefel, F. Vignols, W. B. Bruce, D. Peterson, P. Puigdomenech, J. Rigau. 1996. "The maize caffeic acid *O*-methyltransferase is active in transgenic tobacco and maize plant tissues". Plant Molecular Biology 31 : 307-322.

Heiken, S. Becker, I. Bastisch, R. E. Schmidt. 1998. "HIV-1 infection in a heterosexual male homozygous for CCR5 $\Delta$ 32", angenommen in AIDS.

#### Tagungsbeiträge

- 09/96        27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hamburg (Poster)  
I. Bastisch, C. Nischan, M. Deckert, A. Bernard, R. E. Schmidt, and J. Schubert. 1996. "A GPI-anchor deficient mutant cell line and its use to study gene therapy approaches in vitro". Immunobiology 196 (1-3): 276 (abstract).
- 03/97        13. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Binz (Vortrag)
- 04/97        Euroconference on Stem Cells for Gene Therapy: Vectors, Sitges, Spanien (Poster)
- 07/97        10<sup>th</sup> conference on Molecular Biology of Hematopoiesis, Hamburg (Poster)  
I. Bastisch, C. Scholz, J. Schubert, and R. E. Schmidt. 1997. "*PIG-A* gene transfer in GPI deficient and hematopoietic cells". Acta Haematologica 98 (suppl. 1): 54 (abstract).
- 12/97        Annual meeting of the American Society of Hematology, San Diego  
I. Bastisch, C. Scholz, R. E. Schmidt, and J. Schubert. 1997. "Retroviral gene transfer of *PIG-A* into GPI-deficient hematopoietic cells". Blood 90 (10,suppl. 1): 10b (abstract).
- 04/98        Current State and Perspectives of Organ Transplantation, Hannover (Poster)
- 07/98        1<sup>st</sup> ISH-EHA combined hematology meeting, Amsterdam (Poster)  
I. Bastisch, A. Ziolek, R. E. Schmidt, J. Schubert. 1998. "*PIG-A* gene transfer into hematopoietic cells using retroviral vectors". British Journal of Hematology 102: 81 (abstract).
- 12/98        Annual meeting of the American Society of Hematology, Miami  
J. Schubert, I. Bastisch, A. Ziolek, M. Hildinger, C. Baum and R. E. Schmidt. 1998. "Highly efficient retroviral *PIG-A* gene transfer into hematopoietic cells". Blood 92 (10,suppl. 1): 381b (abstract).



### Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Phosphatidylinositolglycan-A Gentransfer in Glycosylphosphatidylinositol defiziente Knochenmarkstammzellen“ selbständig verfaßt sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe.

Ferner versichere ich, daß die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, November 1998